

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química



TESIS DOCTORAL

**Producción enzimática de monoglicéridos por esterificación de
glicerina con ácido benzoico y p-metoxicinámico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan José Tamayo Orejuela

Directores
Félix García-Ochoa Soria
Miguel Ladero Galán

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



***PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE
MONOGLICÉRIDOS POR
ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA CON
ÁCIDOS BENZOICO
Y *p*-METOXICINÁMICO***

**Memoria que para optar al grado de doctor
presenta:**

Juan José Tamayo Orejuela

**BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:
FÉLIX GARCÍA-OCHOA SORIA
MIGUEL LADERO GALÁN**

Madrid, 2014

A mi Familia y a Laura

El Profesor Dr. Félix GARCÍA-OCHOA SORIA, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, y el Dr. MIGUEL LADERO GALÁN, Profesor Titular de la misma Universidad, afirman haber dirigido el presente trabajo en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Los Directores,

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dr. Miguel Ladero Galán

Quiero mostrar, en primer lugar, mi más profundo agradecimiento, a los directores de esta Tesis Doctoral, los profesores Félix García-Ochoa Soria y Miguel Ladero Galán, por todo su apoyo y su guía. He aprendido mucho de ustedes y siempre estaré agradecido por la enorme paciencia y dedicación que han tenido para conseguir llevar este trabajo adelante.

De igual forma, agradecer también a la profesora Victoria Santos, así como al resto de los profesores del grupo, por su cercanía y buena predisposición.

Gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio: Souto, Jesús, Ernesto, Igor, Vane, Sebas, Javi, Cris, Jaime, Sonia, Paula, Miguel y Vecky. A lo largo de distintas etapas o de todas ellas, ustedes han sido buenos consejeros y han permitido que el día a día fuese mucho más llevadero. Compartidas, las penas parecen menos. Mención especial a la otra Cris y a Carol, por su participación y contribución a este trabajo.

Gracias a mis amigos, por ayudarme a ver la luz al final del túnel y confiar siempre en mí. Y muy especialmente a mi familia, por estar siempre ahí, a mi lado, aunque haya kilómetros entre nosotros, por empujarme a no dejar de ser curioso y seguir buscando más. Nunca he dejado de sentir su aliento, incluso en los peores momentos. Y gracias también a mi familia de este lado del charco. Su apoyo ha sido también muy importante.

Y gracias a Laura, por su alegría de vivir. Por empujarme a no cejar en este camino, a pesar de lo duro que resultara a momentos. Eres el corazón de mi esfuerzo diario y buena parte del mérito de este trabajo es tuyo.

Indice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La Glicerina.....	4
1.1.1. Aplicaciones de la glicerina	8
1.2. Esterificación.....	11
1.2.1. Aplicaciones de los ésteres	13
1.3. Esterificación de glicerina.....	15
1.4. Ácidos aromáticos.....	17
1.4.1. El ácido benzoico y sus ésteres	19
1.4.2. El ácido p-metoxicinámico y sus ésteres.....	20
1.5. Lipasas.....	21
1.5.1. Desactivación enzimática	25
1.5.2. La lipasa B de Candida antarctica.....	28
1.6. Objeto y Alcance del trabajo	30
1.7. Bibliografía	33
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
2.1. Materiales.....	41
2.2. Equipos	43
2.2.1. Instalación experimental.....	43
2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	44
2.2.3. Cromatografía líquida HPLC/Espectrómetro de Masas.....	46
2.2.4. Resonancia magnética nuclear (NMR).....	46
2.2.5. Espectrofotometría UV-Vis	46
2.2.6. Simulador solar	47
2.2.7. Analizador de área superficial y tamaño de poro	48
2.3. Métodos	49
2.3.1. Desarrollo de un experimento de esterificación.....	49
2.3.2. Métodos de análisis.....	49
2.3.3. Caracterización química de producto	54
2.3.4. Propiedades de filtros solares	57
2.3.5. Caracterización del soporte de la enzima inmovilizada	62
2.4. Métodos de Ajuste Matemático	65

2.5.	Bibliografía	70
3.	ESTERIFICACIÓN de GLICERINA y ÁCIDO BENZOICO con LIPASA B de CANDIDA ANTARCTICA LIBRE.....	73
3.1.	Experimentos Previos	77
3.1.1.	Comparación de diferentes enzimas	77
3.1.2.	Intervalo de condiciones de operación	79
3.1.3.	Estudios de inhibición y desactivación	81
3.2.	Resultados de los Experimentos Cinéticos	88
3.3.	Interpretación de los Resultados.....	98
3.3.1.	Determinación del modelo cinético.....	98
3.3.2.	Validación del modelo cinético	110
3.4.	Bibliografía	114
4.	ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA CON ÁCIDO BENZOICO CATALIZADA POR NOVOZYM® 435.....	119
4.1.	Experimentos Previos	122
4.1.1.	Caracterización de Novozym® 435	122
4.1.2.	Efecto de la concentración de ácido benzoico y de la temperatura	131
4.1.3.	Estudio de la inhibición por productos	132
4.1.4.	Estudio de la transferencia de materia	135
4.2.	Resultados de los Experimentos Cinéticos	139
4.3.	Interpretación de los Resultados.....	146
4.3.1.	Determinación del modelo cinético.....	146
4.4.	Estudio de los fenómenos de transporte	152
4.4.1.	Transporte Externo.....	155
4.4.2.	Transporte Interno	157
4.5.	Bibliografía	164
5.	ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA Y ÁCIDO BENZOICO CON NOVOZYM® 435 CON ADICIÓN DE AGUA.....	171
5.1.	Experimentos Previos	174
5.1.1.	Solubilidad de ácido benzoico en mezclas glicerina/ agua.....	174
5.1.2.	Propiedades mezclas glicerina/ agua.....	176

5.1.3.	Estudio de la transferencia de materia	178
5.1.4.	Efecto de la temperatura y de la concentración de ácido benzoico	182
5.2.	Resultados de los Experimentos Cinéticos	183
5.3.	Interpretación de los resultados	188
5.3.1.	Determinación del modelo cinético.....	188
5.4.	Estudio teórico del transporte de materia.....	194
5.5.	Esterificación en condiciones de sobresaturación.....	196
5.6.	Bibliografía	198
6.	ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA Y ÁCIDO METOXICINÁMICO CON NOVOZYM®435.....	203
6.1.	Experimentos Previos	204
6.1.1.	Solubilidad de ácido metoxicinámico en mezclas glicerina/agua	204
6.1.2.	Estudio de la transferencia de materia	207
6.2.	Resultados de los Experimentos Cinéticos	211
6.3.	Interpretación de los resultados	217
6.3.1.	Determinación del modelo cinético.....	217
6.4.	Caracterización del producto.....	223
6.4.1.	Hidrofilicidad/ Hidrofobicidad	224
6.4.2.	Actividad filtro UV (SPF).....	226
6.4.3.	Fotoestabilidad	228
6.5.	Bibliografía	231
7.	RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	235
7.1	Resumen.....	235
7.2	Conclusiones.....	243
8.	NOMENCLATURA	253
9.	ABSTRACT	257

1.- Introducción

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología, y más concretamente, la biocatálisis, ocupa, en la actualidad, un lugar relevante dentro de los procesos de síntesis de compuestos químicos de interés industrial. Los catalizadores naturales o biológicos son responsables de controlar y regular prácticamente todas las reacciones químicas necesarias para el desarrollo de la vida y, desde la antigüedad, el ser humano ha sido capaz de utilizarlos en su beneficio para, por ejemplo, la fermentación de bebidas alcohólicas, la fabricación del queso y del yogurt, entre otros procesos.

Las enzimas son catalizadores de origen biológico (biocatalizadores) con una elevada actividad (una frecuencia de reposición – o "turnover frequency"- hasta 10^7 s⁻¹, siendo lo habitual en procesos catalíticos tradicionales valores entre 0,01 y 100 s⁻¹) y selectividad (tanto de posición –regioselectividad- como espacial –enantio y estereoselectividad-). Estas proteínas, por ser los catalizadores del metabolismo de los seres vivos, operan en condiciones suaves de presión, temperatura, pH y fuerza iónica. Además, su naturaleza proteica y, por tanto, polimérica, determina sus funciones catalíticas (actividad, especificidad, selectividad y estabilidad), siendo muy baja su estabilidad si se compara con otros catalizadores, al ser mucho más inestable su estructura. Esta característica es la que está detrás de numerosos estudios de estabilización, que se han centrado en la selección adecuada de disolventes, sustratos y condiciones de operación, por una parte, y en la modificación genética y química de los microorganismos productores, por una parte, y de las propias enzimas, por otra. Dentro de esta línea de trabajo, se han dedicado numerosos esfuerzos en diseñar, formular y sintetizar varios preparados enzimáticos soportados y/o fijados con propiedades catalíticas mejoradas (en especial, su estabilidad). Estas enzimas inmovilizadas permiten un uso en procesos continuos sin o con baja lixiviación de la proteína, lo que redundará en el desarrollo de procesos enzimáticos de elevada producción (por ejemplo, la producción de jarabes ricos en fructosa a partir de glucosa usando como

catalizador la enzima glucosa-isomerasa inmovilizada y dispuesta en reactores de lecho fijo) que, por la naturaleza del biocatalizador- son muy estables.

En la actualidad, la mejora en los procesos de producción y purificación de enzimas ha reducido su precio en mercado y aumentado su producción. Esta realidad ha sido el fruto de numerosos estudios y desarrollos industriales por modificación genética de los microorganismos originarios, por la generación de nuevos productores microbianos de fácil cultivo y elevada productividad – hongos del género *Aspergillus*, sobre todo-, y por el desarrollo de proteínas con dominios y secciones de interacción específica con moléculas, átomos e iones fijados en soportes sólidos. Estas herramientas también han favorecido la introducción de enzimas de extremófilos, más estables o activas, expresándola en hongos y levaduras que las producen en mucha mayor cantidad que los microorganismos originarios en condiciones de fermentación más comunes y, por tanto, más económicas. En estas circunstancias, el mercado de enzimas ha crecido desde 1990 a un ritmo sostenido superior al 4% anual, aumentando en estos primeros años del siglo XXI de los 1300 millones de dólares de 2002 hasta los 5600 millones de dólares de 2009 (Sarrouh y col., 2012).

Desde las aplicaciones tradicionales de las enzimas en detergentes y alimentación –de un solo uso-, propias de principios y mediados del siglo XX, las mejoras en la formulación de estos catalizadores, causa y consecuencia de un mayor conocimiento de su estructura y propiedades, han sido tales que ya, desde los años noventa, comienzan a ser catalizadores interesantes para la síntesis orgánica, y, además, los estudios en inmovilización y en desarrollo de procesos, han permitido su uso repetido y la mejora de sus propiedades catalíticas. Así, se vislumbra un futuro prometedor en la transformación de materias primas procedentes de la biomasa y de recursos fósiles a escalas mucho mayores que las desarrolladas hasta ahora en industrias de productos de consumo de alto y medio valor añadido, desarrollándose aplicaciones para nuevas clases de enzimas, como las oxidoreductasas. Al mismo tiempo, las industrias que han utilizado estos biocatalizadores de forma tradicional, verán sus procesos notablemente mejorados según se amplíen las aplicaciones de las enzimas.

A día de hoy, las enzimas se aplican en numerosas industrias, desde producciones de alto tonelaje de compuestos de valor añadido bajo, hasta aplicaciones mucho más limitadas en su producción, pero orientadas a productos de alto valor añadido (sobre todo, en industria cosmética y farmacéutica). En la aplicación industrial de enzimas están interesadas y desarrollan actividades de I+D empresas como BASF, DSM, Novozymes, Südzucker, Nito, Tosso, FujiOil, Degussa, Avensis y Tanabe, por nombrar algunas de las más importantes. La siguiente lista de aplicaciones y producciones pretende, sin ser exhaustiva, dar una idea de la influencia industrial de las enzimas (Buchholz y col., 2012):

- Producción de jarabes ricos en fructosa (HFCS) > 10 millones t/año.
- Producción de bioetanol de primera generación >10 millones t/año.
- Producción de acrilamida con nitrilasa > 10.000 t/año.
- Producción de leche deslactosada > 10.000 t/año.
- Producción de ácido 6-aminopenicilámico > 10.000 t/año.
- Producción de aspartamo > 1000 t/año.
- Producción de ácido R-mandélico > 300 t/año.

Por otro lado, la escasez y agotamiento de las fuentes de energía convencionales han llevado a Europa a establecer normas para encontrar soluciones a esta situación. Así, la Directiva 2009/28/CE obliga a todos los Estados Miembros a que, para el 2020, el 10% de la energía destinada al transporte proceda de fuentes renovables. Los biocombustibles se han convertido en una de las firmes alternativas para luchar contra la insuficiencia y la dependencia energética. En concreto, la producción de biodiesel aumentó considerablemente en los últimos años, lo que ha supuesto un incremento notable de la producción de glicerol, al ser este compuesto el subproducto mayoritario. Como consecuencia, el precio en el mercado de este poli-alcohol ha disminuido, despertando el interés por nuevas aplicaciones directas e

indirectas de este compuesto, principalmente en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Pagliaro y col., 2008).

La reacción de esterificación es una de las vías más utilizadas para la transformación de la glicerina. Puede llevarse a cabo por vía térmica o catalítica (homogénea o heterogénea). En este último caso, las enzimas juegan un papel muy importante. Los monoglicéridos y diglicéridos, obtenidos mediante la esterificación de glicerina con ácidos carboxílicos, son de gran interés en las industrias ya citadas: cosmética, farmacéutica y alimentaria. Normalmente, se usan como disolventes (Ogliaruso y col., 2010), aditivos alimentarios (Brewster, 1987), emulsionantes (Pagliaro y col., 2008) o como antioxidantes (Batovska y col., 2005), entre otras aplicaciones.

Dentro de este marco, este trabajo se centra en el estudio de la producción enzimática de ésteres de glicerina y ácidos fenólicos, utilizando lipasas como catalizadores de la reacción. Concretamente, se centra en la obtención del monoéster de los ácidos benzoico y p-metoxicinámico catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*, productos con aplicaciones muy interesantes para la industria farmacéutica y cosmética, principalmente.

1.1. LA GLICERINA

La glicerina es un líquido incoloro, o amarillo pálido, inodoro y con un ligero sabor dulce, su viscosidad es alta y, en frío, se vuelve gelatinoso; tiene un punto de ebullición de 290 °C y un punto de fusión de 18 °C. Se encuentra de manera natural en células vegetales y animales, normalmente formando parte de una estructura molecular más compleja: el glicerol es uno de los componentes de los triglicéridos (grasas y aceites) y de los fosfolípidos, compuestos abundantes en las células de animales y plantas.

Se trata de una molécula bastante polar, que absorbe agua rápidamente a temperatura ambiente y que, gracias a su tres grupos hidroxilo, posee propiedades como disolvente (ver Figura 1.1). Es soluble en alcoholes simples como el metanol, el etanol y en isómeros del propanol, butanol y pentanol.

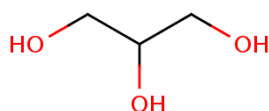


Figura 1.1. Estructura del glicerol(Pagliario y col., 2008)

La glicerina es un compuesto muy versátil, con numerosas aplicaciones, principalmente en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. El glicerol y varios de sus derivados, como el triacetato de glicerol, estearato de glicerol y oleato de glicerol, son actualmente producidos a gran escala por la industria química.

La vía tradicional de obtención del glicerol ha sido la saponificación de las grasas y aceites vegetales. Este proceso no permite la obtención de glicerina en grandes cantidades, no siendo excesivamente abundante la materia prima para síntesis química, lo que ha supuesto precios relativamente altos (2,00 – 2,40 \$/kg). La fermentación de diversos azúcares o la síntesis a partir de cloruro de alilo también han sido otras formas de obtención de este alcohol, aunque en pequeñas cantidades (Chun-Hui y col., 2008). Sin embargo, esta situación ha cambiado en los últimos años, debido al desarrollo del mercado del biodiesel. La glicerina es un subproducto en la manufactura de biodiesel, donde, por cada 100 kg de biodiesel producido, se obtienen en torno a 11 kg de glicerol, con una pureza comercial mínima del 85%.

La separación del glicerol obtenido a partir del biodiesel es relativamente simple, aunque costosa si se precisa una purificación por intercambio iónico para alcanzar el grado de pureza farmacéutica (USP). Se puede centrifugar, una vez que la reacción ha finalizado, o decantar por gravedad. Ambas posibilidades son suficientes para lograr una buena separación inicial. Tras la habitual centrifugación, la glicerina obtenida es apta para sus aplicaciones tradicionales en alimentación animal o como fuente de carbono en bioprocesos. Para aplicaciones en cosmética, farmacia y síntesis química se requiere el grado USP o purísimo (por ejemplo, para producción de polímeros o para obtener surfactantes o lubricantes) (Brewster, 1987; Pagliario y col., 2007).

A pesar de que hay multitud de usos para el glicerol, los mercados de la mayoría de sus productos derivados son pequeños y fragmentados. El mercado de la glicerina se ha caracterizado a lo largo de los años por experimentar grandes cambios, producidos por descompensaciones constantes entre oferta y demanda del producto. Así, por ejemplo, a mediados de la década de los 90, la industria de la glicerina se vio marcada por un suministro deficitario, que no podía satisfacer el aumento de la demanda que se estaba produciendo. En 1999, el suministro de glicerol era abundante, y no se correspondía con la demanda, que se encontraba en pleno descenso. Tras una recuperación durante los años 2000-2002, la situación actual del mercado de la glicerina vuelve a venir marcada por un suministro excesivo, debido, como ya se ha comentado, a un aumento significativo de la producción de biodiesel, especialmente en Europa (Miller Klein Assoc., 2006).

La consecuencia del aumento de la cantidad disponible de glicerina es una reducción en el coste de esta, llegándose a alcanzar un precio en el año 2002, de 1,10 \$/kg (Tyson y col., 2004), hasta los 0,45-0,40 \$/kg en 2006 para el glicerol crudo (Zhou C-H., 2008) y hasta los 0,3-0,35 \$/kg en 2008 para el glicerol del 85%. Con precios por debajo de 1,00 \$/kg, el glicerol se muestra como una materia prima con un interés creciente. Actualmente, en Estados Unidos el precio del glicerol crudo que se obtiene como subproducto del biodiesel se valora a efectos contables entre 0 y 0,07 \$/kg. Incluso algunos productores de biodiesel tienen que pagar por transportar el glicerol a purificar o simplemente deshacerse de él, como un residuo, con precio negativo, por lo tanto (Miller Klein Assoc., 2006). Esta situación lleva a la necesidad imperiosa de buscar nuevas alternativas de aplicación para dicho compuesto y evitar que se convierta en un residuo.

Actualmente, en Europa la producción de biodiesel sigue creciendo y, por ende, la de glicerina, aunque en menor medida que en años anteriores. La producción de biodiesel creció el 65% en 2005 y el 54% en 2006, frente a solo un 16% en el año 2009 (European Biodiesel Board, 2010). A pesar de ello, la producción en este continente sigue aumentando desde los años noventa. Como muestra la Figura 1.2, en la última década la producción mundial de biodiesel se ha multiplicado por 10, alcanzando los 12 millones de toneladas

anuales en 2009. Esta situación ha venido favorecida por la Directiva Europea 2003/30/EU que obliga a sus países miembros a usar un 5,75% de biocarburantes en transportes para el 2010 (aunque no se ha cumplido estrictamente). Alemania, Francia y España se sitúan a la cabeza de la Unión Europea respecto a la producción de este biocombustible. En resto del mundo, países como EE.UU y Brasil, lideran la lista de productores de biodiesel. En el año 2009, Europa consiguió una cuota de producción de dicho carburante del 57%, seguida del continente americano, con un 33%. Asia y Oceanía les seguían de lejos, con una cuota del 7 y del 1%, respectivamente, como puede observarse en la Figura 1.3. Se estima que la producción de biodiesel mundial para los próximos años continuará creciendo, pero no tan aceleradamente (Torres y Carrera, 2010; Biofuels Platform, 2012).

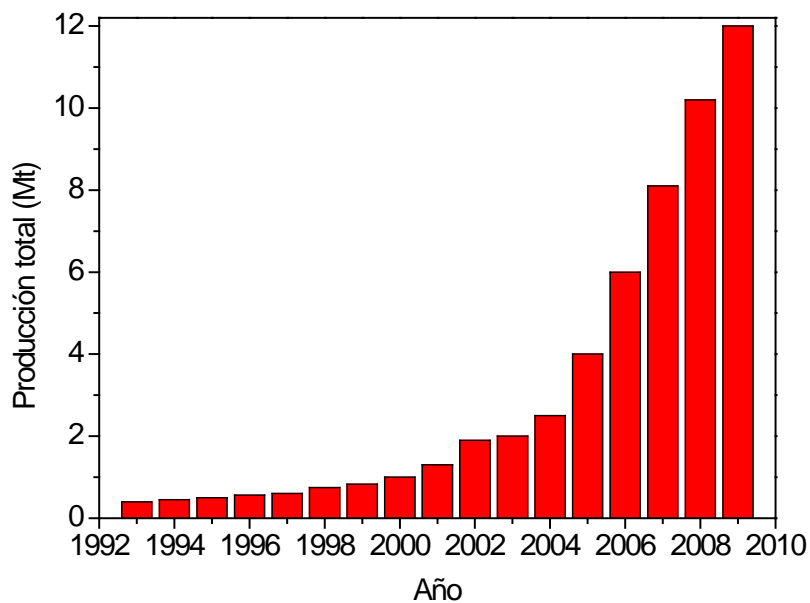


Figura 1.2. Producción mundial de biodiesel
(Demirbas y col., 2010; Torres y Carrera, 2010)

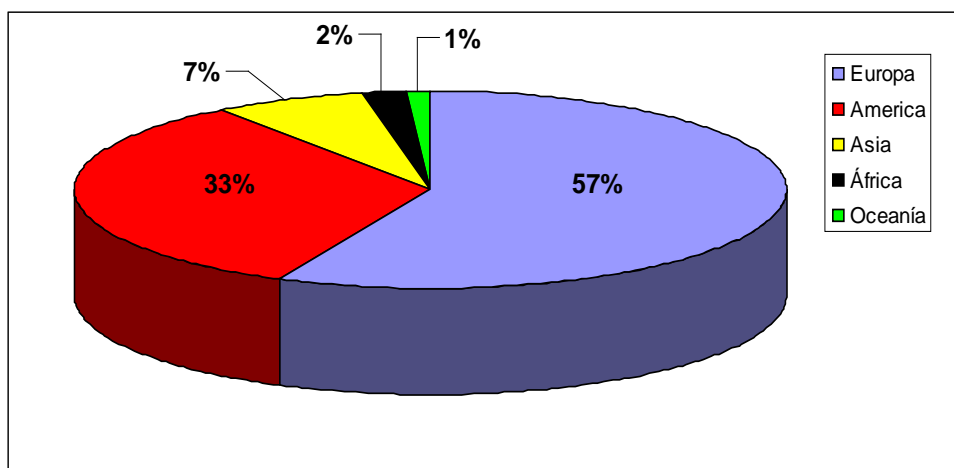


Figura 1.3. Producción mundial de biodiesel en 2009 (12 Mt/año)
(Torres y Carrera, 2010; Biofuels Platform, 2012)

1.1.1. Aplicaciones de la glicerina

Las aplicaciones del glicerol son similares a las de otros poli-alcoholes, por ello, ha podido incrementar su campo de aplicación, introduciéndose en sectores que han sido ocupados tradicionalmente por otros productos, como sorbitol y pentaeritritol (Baumann y col., 1988). Desde un punto de vista técnico, el glicerol es capaz de desplazar a estos poli-alcoholes en muchas aplicaciones: como ingrediente de pastas dentífricas, de productos humectantes y cosméticos, en la formulación de poliuretanos y resinas alquídicas, etc. Desde un punto de vista económico, esto depende de los precios relativos, y de las propiedades, del glicerol y del polialcohol cuyo uso desplaza.

Los tres grandes sectores industriales que aglutinan el grueso de las aplicaciones para este compuesto son: la industria alimentaria, la cosmética y la farmacéutica, sumando, entre todas, el 64% del consumo del glicerol refinado. Se estima que, en los próximos años, para las industrias farmacéutica y cosmética se producirá un crecimiento anual del 2,8%, de un 15% para la industria tabaquera y de un 13% para la alimentaria (Pagliaro y col., 2008).

La glicerina tiene tanto usos directos como indirectos (síntesis de derivados). Dentro de los directos, en la industria cosmética es bien conocida

su aplicación como emulgente (en las cremas) y suavizante (en los jabones). La buena solubilidad y sabor de la glicerina son una ventaja frente al sorbitol, en su uso para pasta de dientes y otros productos de higiene dental. En dicho sector, el uso de glicerol ha venido creciendo a un ritmo del 3,5% al año. Las causas fundamentales de este incremento se encuentran en el aumento espectacular del consumo de cremas de protección solar y de productos para cuidados de bebés. Sin embargo, el sector que ha crecido más significativamente es el de la industria alimentaria, donde el glicerol es muy empleado como lubricante, disolvente, humectante, edulcorante y como conservador de los alimentos. Igualmente, destaca su uso como fuente de carbohidratos en el mundo del deporte, ya que da energía sin incrementar las grasas corporales (U.S. Soybean Export Council, 2007). En los últimos años, se consumieron en productos relacionados con esta industria unas 80 t/año, bien como glicerina directamente o bien en forma de derivados, como glicerol mono-estearato, principalmente. El crecimiento del mercado de la glicerina en este sector está situado en un 4 % anual. Este alto porcentaje se explica por la tendencia actual de disminuir el contenido de grasas en los alimentos, particularmente en productos de panadería. En la industria tabaquera, un 11% de la demanda de glicerol puro es para su utilización como humectante en la fabricación de tabaco.

Con respecto a sus usos indirectos, la industria alimentaria, la cosmética y la de plásticos y polímeros han desarrollado aplicaciones de este poli-alcohol. Algunas aplicaciones en alimentación incluyen su uso como materia prima para la síntesis de ácido láctico (Fan y col., 2010) y el triacetín (Nemeth y col., 2008). En la industria cosmética se aplica para obtener un bronceante, como la 1,3-dihidroxiacetona (Ciriminna y col., 2006), y varios poli-gliceril-ésteres y acetales (Nemeth y col., 2008), por ejemplo. La industria polimérica se beneficia de sus aplicaciones para obtener monómeros, como acetales, monoglicéridos, carbonato de glicerol y 1,3-propanodiol (Zhou C-H., 2008) (Nemeth y col., 2008) (Cheng, 2008), y resinas, como los ésteres con ácidos resínicos (Ladero y col., 2011). Algunas aplicaciones indirectas para la producción de compuestos químicos básicos incluyen su uso para obtener etanol y acroleína (Jarvis y col., 1997) (Fan y col., 2010). Las propiedades del

biodiesel pueden ser mejoradas mediante aditivos, sintetizados a partir del glicerol, como sus quetales (Norhasyimi y col., 2010). En la Figura 1.4 se esquematiza el mercado actual del glicerol.

Sin embargo, no todos los sectores se encuentran en crecimiento. Así, es interesante comprobar que las aplicaciones más técnicas del glicerol (a excepción de las referentes a la producción de polia-lcoholes) no han aumentado su producción; las resinas alquídicas han pasado, en los últimos años, de suponer un 17 % del mercado total del glicerol a solo un 6 %; las películas de celulosa han pasado de un 8 % a un 3 % y la nitración ha disminuido de un 9 % a un 0,2 %. Estos descensos no son absolutos, sino relativos, al aumentar las aplicaciones directas, como ya se ha indicado.

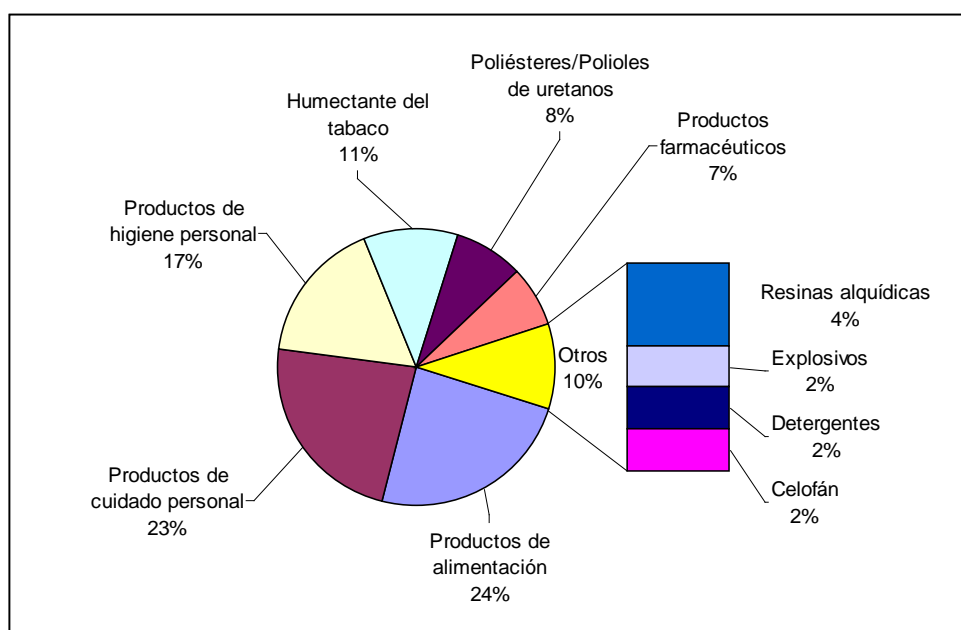


Figura 1.4. Mercado actual del glicerol
(Pagliaro y col., 2007; U.S. Soybean Export Council, 2007).

La bajada del precio del glicerol, es de suponer, conseguirá abrir huecos significativos en mercados de gran tonelaje como el de polímeros y éteres, o de producción mediana, como antioxidantes y biosurfactantes. De todas estas posibilidades, este trabajo se centra en la obtención por vía enzimática de ésteres con ácidos fenólicos.

1.2. ESTERIFICACIÓN

Las reacciones de esterificación son ampliamente usadas en numerosas industrias como la farmacéutica, la cosmética y la alimentaria; otras destacadas son las de plásticos y polímeros. Además, es una de las vías más utilizadas para la transformación de la glicerina.

Esta reacción tiene lugar cuando interacciona un oxácido con un grupo hidroxilo, generalmente un alcohol o fenol. La reacción de esterificación más habitual se produce entre un ácido orgánico carboxílico ($R\text{-COOH}$) y un alcohol ($R'\text{-OH}$), obteniéndose un éster ($R\text{-COO-R}'$) y agua. Habitualmente, los alcoholes utilizados son de cadena corta (metanol o etanol), por su amplia disponibilidad y elevada reactividad. Igualmente ocurre con los ácidos, siendo los más sencillos los que permiten la formación del éster con mayor facilidad. Estas reacciones suelen ser reversibles, por lo que no llegan a desaparecer por completo los reactivos. Es por ello que muchos autores provocan el desplazamiento del equilibrio de la reacción para favorecer la formación de los productos deseados con distintas técnicas: eliminando el agua utilizando altas temperaturas o vacío, provocando el cambio de estado de un producto, empleando tecnología de membranas (pervaporación), tamices moleculares o sales higroscópicas (Urtiaga y col., 2003; Wang, 2007; Petkar y col., 2008).

Estos procesos pueden realizarse en presencia o ausencia de catalizador que, a su vez, puede ser homogéneo o heterogéneo (Soltes y col., 1989). Los catalizadores homogéneos más empleados son el ácido clorhídrico (HCl) y el sulfúrico (H_2SO_4), debido a su fuerte acidez. Sin embargo, al estar disueltos en el medio de reacción, su separación suele ser bastante costosa. Por otro lado, los catalizadores sólidos ácidos, como las resinas de intercambio iónico, pueden separarse más fácilmente (por filtración) y son reutilizables (acidificándolas para un nuevo uso).

Hoy en día, las enzimas son una opción muy interesante y cada vez más utilizada para llevar a cabo las reacciones de esterificación. Entre las más empleadas industrialmente se encuentra la lipasa B de *Candida antarctica*

(CALB), o sus derivados inmovilizados, como Novozym® 435, que es producido por la empresa Novozymes (Yahya y col., 1998).

Para entender cómo funciona una esterificación es preciso describir su mecanismo. Como se muestra en la Figura 1.5, para que la reacción se produzca es necesario el ataque del nucleófilo del oxígeno de una molécula del alcohol al carbono del grupo carboxílico. De esta manera, el protón migra al grupo hidroxilo del ácido que luego es eliminado como agua. El catalizador ácido favorece la formación del carbocatión mediante la protonación del grupo carboxílico, facilitando el ataque del alcohol. Este proceso implica que el catalizador debe ser un ácido más fuerte que el ácido a esterificar.

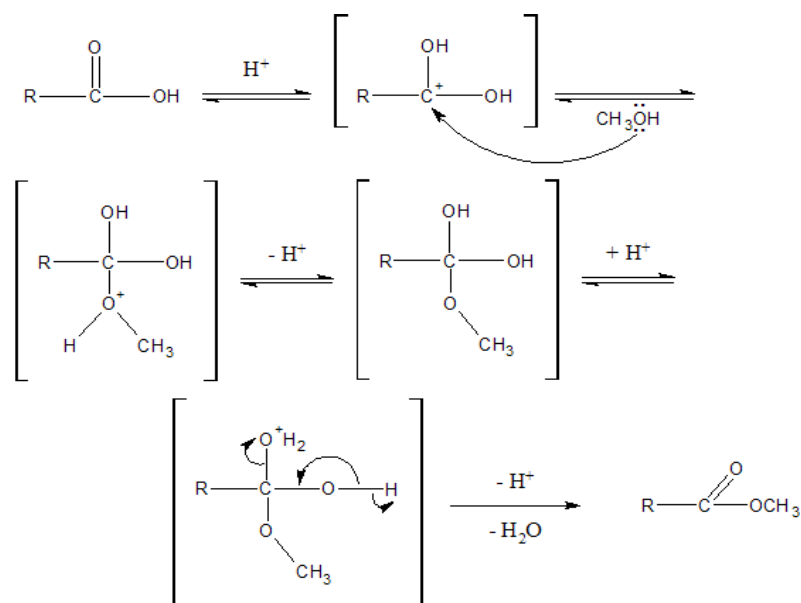


Figura 1.5. Mecanismo de la esterificación utilizando catalizadores ácidos.

Por otro lado, la biocatálisis implica la interacción de las especies reaccionantes con el centro activo de la enzima (secuencia de aminoácidos). Como se muestra en la Figura 1.6, en un proceso de esterificación, el ácido y el alcohol interaccionan de forma secuencial con las diferentes especies formadas con la tríada catalítica que conforma el centro activo de la enzima, que tanto por polaridad como por conformación espacial, moderan la intensidad de las interacciones con según qué reactivos, dependiendo de su naturaleza. Es aquí donde radica el especial interés de la biocatálisis, ya que las enzimas son

catalizadores más específicos y selectivos. Más adelante, en este trabajo, se explica este mecanismo con algo más de detalle.

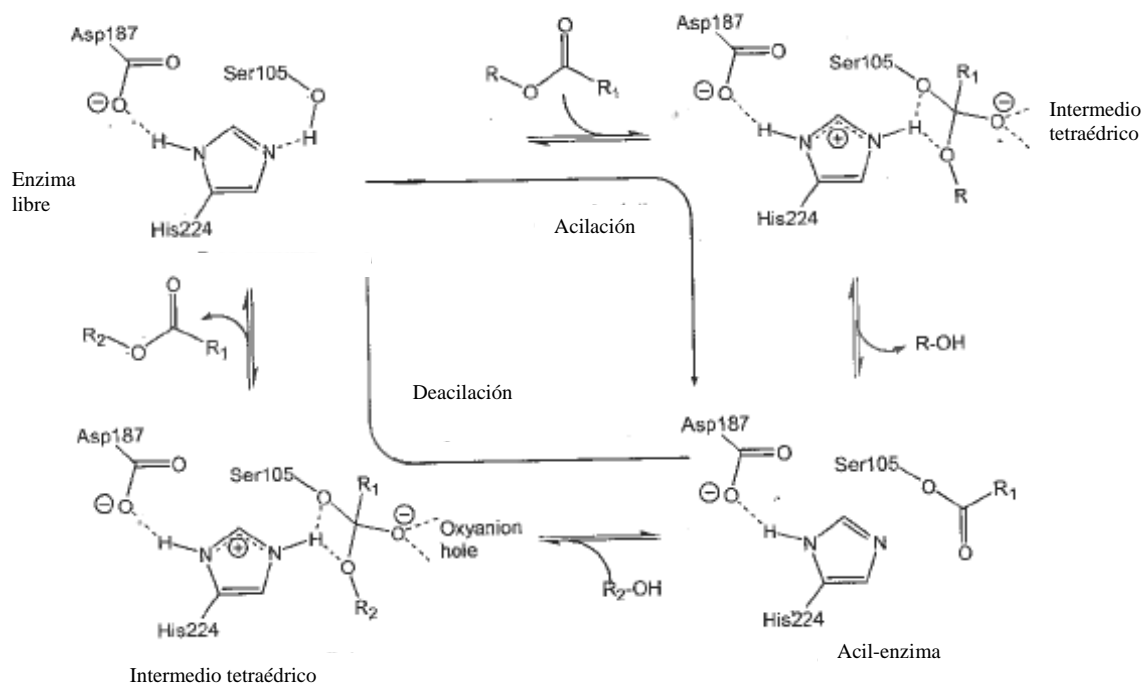


Figura 1.6. Mecanismo de una reacción de esterificación o transesterificación catalizada por la isoenzima B de *Candida antártica* (CALB) (Ottosson y col., 2001)

1.2.1. Aplicaciones de los ésteres

En muchos sectores industriales y, en especial, el químico, las aplicaciones de los ésteres son múltiples y variadas. Es bien conocida su presencia en la naturaleza, dando el aroma a muchas frutas conocidas (fresas, plátanos, etc.). Se caracterizan por ser líquidos neutros, sin color, con un olor agradable, solubles en disolventes orgánicos y con solubilidad en agua condicionada por el tamaño y características de la molécula. Debido a su participación como aceptores en los enlaces de hidrógeno, estos compuestos son más solubles en agua que cualquier otro hidrocarburo con el mismo número de carbonos. Son más polares que los éteres pero menos que los alcoholes. A su vez, son más volátiles que un alcohol o ácido de similar peso molecular.

En la industria hay infinidad de aplicaciones para los ésteres como disolventes, aditivos industriales, aromas, saborizantes, explosivos, alimentos, monómeros, cosméticos y fármacos. Entre los disolventes industriales más comunes destacan los acetatos de los alcoholes metílico, etílico y butílico. La producción mundial de acetato de etilo ronda las 1,2 Mt/año y dicho compuesto es mundialmente conocido como disolvente en barnices para las uñas, fragancias, adhesivos, pinturas. Un disolvente aplicado en aceites y resinas es el acetato de metilo. Los aditivos en combustibles pueden ser ésteres de glicerina de elevado peso molecular (C16-C18) (Brewster, 1987). Así mismo, gracias a su olor afrutado, se suelen utilizar en la industria cosmética y alimentaria para la fabricación de perfumes, aromas artificiales o aditivos alimentarios, como en los caramelos. El sabor a menta en la pasa de dientes o en los chicles es obra del salicilato de metilo, además de ser el principal ingrediente en las gaseosas “birch beer”. El éster del ácido nítrico y la glicerina es un potente explosivo llamado nitroglicerina. La mayoría de los insecticidas contienen ésteres (Ogliaruso y col., 2010). Los polímeros de los plastificantes pueden volverse quebradizos, por lo que normalmente se emplean los ftalatos de dialquilo para conservar sus propiedades. Otros ésteres como el acetatopropionato y el acetatobutirato de celulosa se utilizan como materiales termoplásticos. (Otera y col., 2010). En el sector de la industria farmacéutica hay numerosos fármacos y profármacos con la función éster. Probablemente, el más famoso es la aspirina o ácido acetilsalicílico, uno de los numerosos antiinflamatorios no esteroideos disponibles hoy en día, y el primero de esta familia de fármacos en ser sintetizado. Actualmente, se aplica en numerosas enfermedades por sus múltiples propiedades: antiinflamatorias, analgésicas y de prevención contra el infarto de miocardio, entre otras.

1.3. ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA

En la actualidad, los ésteres de glicerina con ácidos carboxílicos de mayor producción son los triglicéridos, en especial los triésteres de ácidos resínicos (De Gracia, 2009). Sin embargo, la tendencia para un futuro próximo es que los mono- y di-glicéridos se conviertan en compuestos muy utilizados, incluso prioritarios en algunas industrias. No obstante, ya se usan ampliamente en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Un ejemplo es la utilización de ésteres de ácidos grasos como aditivos en aceites lubricantes (Brewster, 1987).

Los emulsionantes sintéticos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y cosmética, entre ellos destacan los mono- y di-glicéridos. El mercado de estos productos en alimentación fue de más de 400 kt/año en el año 2006, siendo un 10% aproximadamente mono-oleínas (mono-glicéridos de ácido oleico). Otros mono-ésteres, como el mono-estearato de glicerol (GMS), se emplean como aditivos en la fabricación de margarina, pan y en otras industrias como la farmacéutica y la cosmética.

Con respecto a la industria alimentaria, los di-glicéridos están siendo incorporados en los aceites de fritura. Como consecuencia del problema de obesidad al que se enfrentan muchos países, la empresa japonesa Koa sintetiza y comercializa aceites ricos en diglicéridos. Dichos ésteres son más estables a altas temperaturas y no se absorben tan fácilmente en el intestino, por lo que se evita la acumulación de los mismos en el organismo (Pagliaro y col., 2008). Así mismo, los diglicéridos pueden ser usados como intermedios en la síntesis de triglicéridos regioselectivos, quirales y de fosfolípidos (Mank y col., 1976).

Del mismo modo, hay que hacer hincapié en el uso de los mono-, di- y triglicéridos en la industria cosmética. Los tri-glicéridos de cadena corta, como los del ácido caprílico o poli-glicerol de los ácidos linoleico y linolénico, son ampliamente utilizados en este sector (Santus y col., 2009). Los mono-glicéridos son emulsionantes y emolientes de amplio uso, además de

componentes en otros productos como los desodorantes y preservativos. También puede decirse que, tanto los mono- como los di-glicéridos, se emplean en las cremas y lociones corporales para mejorar la consistencia de estos productos (Pagliaro y col., 2008).

De manera general, las aplicaciones de los ésteres de glicerina son las siguientes:

- Dispersantes y disolventes para principios activos.
- Vehículos para inyectables.
- Emulsionantes.
- Agentes sobre-engrasantes para champú, baños de espuma, y preparados a base de soluciones alcohólicas.
- Agentes que facilitan la incorporación de principios activos liposolubles.
- Recubrimientos alimentarios, formando un film que evita la oxidación y la pérdida de peso.
- Lubricantes alimentarios.
- Diluyentes de perfumes.
- Productos intermedios en la industria textil y de curtición.

Algunos estudios recientes desarrollan nuevas aplicaciones para los ésteres de glicerina como filtros de protección solar en las cremas solares. En particular, se han llevado a cabo reacciones de esterificación de glicerina con ácidos fenólicos, como el ácido cinámico y el p-metoxicinámico (Holser, 2008; Molinero, 2012).

1.4. ÁCIDOS AROMÁTICOS

Los compuestos fenólicos poseen, al menos, un grupo hidroxilo unido de manera directa o mediante una cadena a un anillo aromático, siendo el fenol el más simple de ellos. Partiendo de esta base, existen otros compuestos que contienen más de un grupo hidroxilo y/o grupo bencénico.

Estos compuestos están presentes en la naturaleza como metabolitos secundarios en las plantas, llegando al mundo animal mediante la ingestión de las mismas. Las plantas son capaces de sintetizarlos mediante dos vías: la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (Balasundram y col., 2006). La clasificación de los compuestos fenólicos puede realizarse en función de distintos criterios, por ejemplo, considerando el número de carbonos, tanto de los anillos aromáticos, como los pertenecientes a la/s cadena/s unidas a dichos anillos, tal y como se muestra en la Tabla 1.1.

Uno de los grupos más importantes son los llamados ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos comprenden dos grupos: los ácidos benzoicos (C6-C1) y los cinámicos (C6-C3). Los derivados del ácido benzoico se encuentran de forma libre en la naturaleza, fundamentalmente como ácidos (ácido vanílico y ácido gálico, por ejemplo) o aldehídos (como vanillina y anisaldehído). Todos poseen una estructura común y se diferencian en el número de grupos hidroxilo y metoxi, como se muestra en la Tabla 1.2. Los derivados del ácido cinámico son abundantes en las plantas. Los ácidos benzoicos mantienen una estructura común y varían sus grupos funcionales, como se aprecia en la Figura 1.7. Los ácidos fenólicos, particularmente el cafeico, ferúlico y sinápico y sus ésteres, son reconocidos por su actividad antioxidante, su capacidad como captadores de radicales peróxido y como inhibidores de carcinogénesis. Su actividad antioxidante depende fuertemente de su estructura y de la presencia de grupos hidroxilo y metoxi en su estructura aromática (Gaspar y col., 2009).

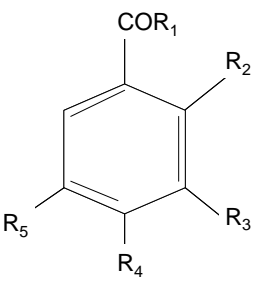
En la actualidad, los ácidos fenólicos tienen múltiples aplicaciones, principalmente en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. El presente trabajo se centra en el estudio de dos representantes de los dos

grupos que conforman los ácidos fenólicos, el ácido benzoico y el p-metoxicinámico. Ambas especies, y, en especial, sus ésteres, tienen especial interés industrial.

Tabla 1.1. Clasificación de los compuestos fenólicos en función del número de carbonos.

Numero de carbonos	Grupo
C6	Fenoles simples
C6 -C1	Ácidos benzoicos y relacionados
C6 -C2	Acetofenonas y ácidos fenil acéticos
C6 -C3	Ácidos Cinámicos y relacionados
C6 -C3	Cumarinas y relacionados
C6 -C3 -C6	Flavonoides y relacionados
C6 -C1 -C6	Benzofenonas y Estilbenos
C6 -C2 -C6	Xantonas

Tabla 1.2. Clasificación de los ácidos benzoicos (Sanchez, 2008).

Estructura	R1	R2	R3	R4	R5	Nombre
<p>C6-C1</p> 	OH	-	-	-	-	Acido benzoico
	OH	H	OH	OH	OH	Ácido gálico
	OH	OH	H	H	H	Ácido salicílico
	OH	H	OH	OH	H	Ácido protocatéquico
	OH	H	OCH3	OH	H	Ácido vanílico
	OH	H	OCH3	OH	OCH3	Ácido siríngico
	H	H	OCH3	OH	H	Vanillina
	H	H	H	OCH3	H	Anisaldehído

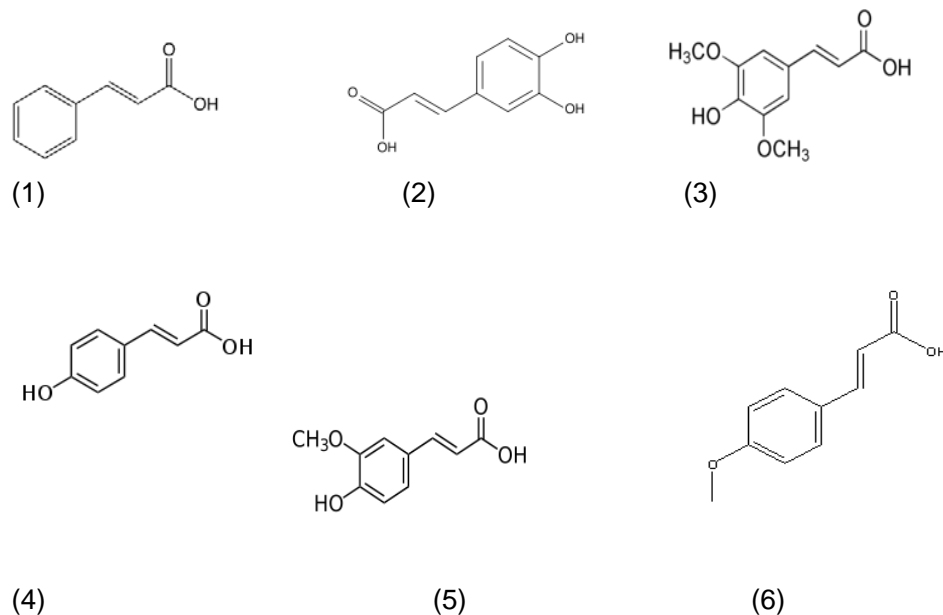


Figura 1.7. Ácidos de la familia del cinámico. (1) cinámico, (2) cafeico, (3) sináptico, (4) cumárico, (5) ferúlico, (6) p-metoxicinámico.

1.4.1. El ácido benzoico y sus ésteres

El ácido benzoico, C_6H_5COOH , cuya fórmula desarrollada se muestra en la Tabla 1.2, es un sólido blanquecino con un olor característico. Su punto de fusión es de $122\text{ }^{\circ}C$ y un punto de ebullición de $249\text{ }^{\circ}C$. Es soluble en disolventes orgánicos y en agua bajo condiciones específicas (0,18; 0,27 y 2,2 g disueltos en 100 mL de agua a 4; 18 y $75^{\circ}C$, respectivamente) (Davidson y col., 2005). Se encuentra naturalmente en alimentos y plantas, como, por ejemplo, en las moras y otros frutos. Es un ácido débil y es precursor de muchas otras sustancias químicas. Sus sales y ésteres son usados como conservantes en productos cosméticos en un máximo de concentración de 0,5 %. Así mismo, se usan como conservantes en alimentos (comida, zumos de frutas, bebidas calientes, etc.), en un rango de pH ácido. Además, este ácido se utiliza como agente antimicrobiano y aromatizante. Se conocen otros usos, como germicida en medicina o como intermedio en la síntesis de plásticos, por ejemplo el dietilenglicol y ésteres del trietilenglicol (Scientific Comitee on Consumer Products, 2005).

El mono-glicérido del ácido benzoico tiene diversas aplicaciones como plastificante (Shigeru, 2003) o en la industria farmacéutica para la síntesis de β -bloqueantes o factores activadores de plaquetas (PAFs), (S)-carnitina y ácido γ -amino-13-hidroxibutírico (GABOB).

Ácidos como el cinámico y el benzoico se utilizan para la fabricación de perfumes, sabores y productos farmacéuticos mediante sus ésteres, como el metil-, etil- y benzil-cinamato, entre otros (Figuerola y col., 2005). Como ya se ha indicado, otra característica que se les atribuye a dichos ácidos es su capacidad antioxidante. Así, se han llevado a cabo estudios sobre la capacidad de reducir la ferritina globina mediante derivados del ácido cinámico y benzoico y la inhibición de la modificación oxidativa de LDL (low-density lipoprotein), inducida por azoiniciadores (2,2-azobis(2-amidinopropano), dihidroclorida (AAPH)) y catalizadores metálicos (Laranjinha y col., 1995).

1.4.2. El ácido p-metoxicinámico y sus ésteres

Otro de los ácidos estudiados en la presente Tesis es un derivado del ácido cinámico, el ácido p-metoxicinámico, $C_{10}H_{10}O_3$. Es un compuesto de color igualmente blanquecino, con un punto de ebullición entre 171 y 175 ° C, cuya molécula desarrollada se muestra también en la Figura 1.7. Sus derivados son muy utilizados en cosmética y farmacia.

Un derivado muy común es el octilmetoxicinamato o 2-etilhexil-p-metoxicinamato ($C_{18}H_{26}O_3$) (OMC), uno de los filtros ultravioleta más usados en las cremas solares. Un ejemplo es su presencia en la fabricación de lociones solares compuestas por butil-metoxidibenzoil-metano (protector UV-A), octilmetoxicinamato y compuestos estabilizadores de bario (Bonda, 2001). Así mismo, el OMC y un polímero poliamínico se utilizan en nuevas composiciones dermatológicas (Boussouira y col., 2002). Otro ejemplo del uso del octilmetoxicinamato es la fabricación de protectores de la piel y el pelo frente al daño ocasionado por los rayos UV, utilizando una mezcla de los compuestos OMC y etil-hexil-salicilato (Langner, 2009). Este compuesto se obtiene de la esterificación del ácido p-metoxicinámico con 2-etilhexanol y se caracteriza por ser un líquido transparente y poco soluble en agua. Otra propiedad es su gran

lipofilicidad, gracias a que no posee ningún grupo hidroxilo. Sin embargo, cuando el OMC es usado en cremas de uso tópico, dicha cualidad se convierte en una desventaja. Algunos estudios han demostrado la trans-dermicidad y los problemas endocrinos asociados a compuestos como el OMC o la 3-bezofenona (BP-3). Este último compuesto, junto con sus metabolitos (dihidroxi metoxi-benzofenona o DHMB y trihidroxi-benzofenona o THB), podrían ocasionar efectos estrogénicos en las células humanas responsables del cáncer de mama (Gonzalez, 2006; Holser y col., 2008). Debido a ello, en los últimos años, se han llevado a cabo estudios para el desarrollo de compuestos con características más hidrofílicas, que impidan la penetración del mismo a través de la piel y, por lo tanto, eviten posibles problemas asociados a su acumulación en el interior del cuerpo y a su eliminación. Un ejemplo es el mono-glicérido obtenido a partir de la esterificación de glicerina con ácido p-metoxicinámico, así como otros ésteres como son el 1,3-dipalmitoil-2-p-metoxicinamoil-1,2,3-propanotriol y el 1,3-dioctanoil-2-p-metoxi-cinamoil-1,2,3-propanotriol (De Freitas y col., 2005; Holser y col., 2008; Holser, 2008; Molinero, 2012).

1.5. LIPASAS

Las lipasas (hidrolasas de éster de triacilglicéridos, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la rotura de grasas y aceites con la consecuente liberación de ácidos grasos, diacil-glicéridos, mono-glicéridos y glicerol. Estas enzimas se encuentran presentes en microorganismos, plantas y animales superiores, en los cuales cumplen un papel trascendental en el metabolismo de los lípidos. Son importantes como enzimas digestivas y como medio para facilitar la deposición y la movilización de las grasas que se utilizan como reserva energética en el organismo. Asimismo, las lipasas participan en el metabolismo intracelular de los lípidos y, por tanto, en el funcionamiento de las membranas biológicas.

A lo largo de los últimos años, las lipasas han sido objeto de múltiples estudios alrededor de sus propiedades bioquímicas y fisiológicas, y, de manera

más reciente, por su potencial aplicación industrial, siendo biocatalizadores tan importantes y aplicados como las proteasas y las carbohidrasas.

La fabricación de detergentes domésticos es el mayor mercado de las enzimas industriales en general, abierto actualmente también para las lipasas, que por medio de técnicas de Ingeniería Genética resultan lo suficientemente estables y activas en las condiciones alcalinas que predominan en los procesos de lavado. Otra de las aplicaciones importantes de estas enzimas es la hidrólisis controlada de las grasas de la leche, un proceso de interés en la fabricación de quesos, mejora de sabor de la mantequilla, producción de quesos como ingrediente de algunos alimentos pre-elaborados, como sopas, salsas, etc. (Liese y col., 1999).

Las lipasas que forman parte de los detergentes suman cerca del 32 % del total de ventas, lo que se traduce en un valor estimado de 1000 toneladas que se añaden a unos 13 millones de toneladas de detergentes que se producen anualmente (Jaeger y col., 1998).

Las lipasas catalizan varios tipos de reacciones. De hecho, aunque de manera natural fueron diseñadas para hidrolizar ésteres de tri-glicéridos (de aquí su aplicación como aditivo en detergentes), las lipasas son también capaces de catalizar la reacción inversa, es decir, la formación de enlaces éster entre un alcohol y un ácido carboxílico en condiciones micro-acuosas. Estos dos procesos básicos pueden, además, combinarse de manera secuencial (trans-esterificación) para generar un gran número de reacciones, de manera que el campo de aplicación de las lipasas es bastante amplio. En la Tabla 1.3 se recogen algunas de las principales aplicaciones industriales y potenciales de las lipasas.

En lo referente a su aplicación en síntesis química, las lipasas tienen un interés especial debido a que mantienen su actividad catalítica en disolventes orgánicos. Se ha estudiado su utilización como catalizador en esterificación, trans-esterificación, acilación regioselectiva de glicoles y mentoles, síntesis de péptidos y otros compuestos químicos donde se convierten grasas y aceites, de gran disponibilidad, en productos de elevado valor añadido para su aplicación en alimentación y la industria relacionada.

Se utilizan cantidades menores de lipasas en transformaciones oleoquímicas (Bornscheuer y col., 2002). Además, tienen un papel importante en la producción de ácido γ -linoleico, un ácido graso poli-insaturado (en inglés, PUFA); astaxantino, un colorante alimentario; metilcetonas, moléculas responsables del característico sabor del queso azul; ácido 4-hidroxicaproico, precursor de la γ -decalactona, que posee un sabor frutal; ácidos dicarboxílicos para su aplicación como pre-polímeros; interesterificación de glicéridos baratos para obtener otros de mayor valor, como la sustitución de la manteca de cacao en la fabricación de chocolate; la modificación de aceites vegetales en la posición 2 del triglicérido, para obtener grasas similares a la grasa de la leche humana para su utilización en alimentos para bebés; ésteres lipídicos como el isopropil-miristato, para su utilización en cosméticos; y mono-glicéridos para usarlos como emulsificantes en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas.

También se pueden encontrar numerosos ejemplos de la aplicación de lipasas en la síntesis enantioselectiva de fármacos (Oberhauser y col., 1989; Hari Krishna y col., 2001; Mezzetti y col., 2003; Larissegger-Schnell y col., 2006) o nuevos surfactantes (Cao y col., 1999; Sharma y col., 2001; Plou y col., 2002; Tarahomjoo y col., 2003; Antczak y col., 2004).

Las lipasas con utilidad industrial se obtienen de microorganismos, bacterias y hongos, que producen una amplia variedad de lipasas extracelulares. En la Tabla 1.4 se recogen algunos ejemplos.

A pesar de que las reacciones catalizadas por lipasas pueden también serlo por catalizadores inorgánicos (derivados metálicos), la utilización de las enzimas permite la producción de una gran variedad de productos de elevada pureza y con ello de alto valor añadido, resultado de su elevada especificidad, con ventajas importantes como la disminución en productos secundarios y los consecuentes costes de su aislamiento y purificación. Además, estas reacciones pueden llevarse a cabo en condiciones suaves de temperatura y pH, inocuas para productos o reactivos termolábiles lo que conlleva, también, una reducción importante en el consumo energético.

Tabla 1.3. Aplicaciones Industriales de las lipasas.

Industria	Acción	Producto o Aplicación
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Eliminación de manchas de grasa de telas
Lácteos	Hidrólisis de grasa de leche, maduración de queso, modificación de grasa de mantequilla	Desarrollo de agentes saborizantes en la leche, queso y mantequilla
Pastelería	Agente saborizante	Prolonga la vida de productos en exposición
Bebidas	Agente aromatizante	Bebidas
Salsas	Mejora la calidad	Salsas
Alimentos "sanos"	Trans-esterificación	Carnes y pescado (eliminación de grasas), mantequilla de cacao, margarina, ácidos grasos, glicerina, mono- y diglicéridos.
Productos Químicos	Síntesis enantioselectiva	"building block" quirales
Fármacos	Trans-esterificación, Hidrólisis	Lípidos especiales, digestivos
Cosmética	Síntesis	Emulsificantes, humidificantes
Cuero	Hidrólisis	Productos de cuero
Papel	Hidrólisis	Papel de calidad mejorada
Limpieza	Hidrólisis	Eliminación de grasas

Tabla 1.4. Algunas lipasas comerciales (Jaeger y col., 1998).

Tipo	Fuente	Aplicación	Compañía
Hongos	<i>C. rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Síntesis orgánica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Aditivo para detergentes	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Procesado de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bacterias	<i>B. cepacia</i>	Síntesis orgánica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Aditivo para detergentes	Genecor
	<i>P. mendocina</i>	Aditivo para detergentes	Genecor
	<i>Ch. viscosum</i>	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts

1.5.1. Desactivación enzimática

Las fuerzas de unión que permiten la conformación nativa de una proteína son débiles. Por ello, es natural que, con poca energía que se le aporte, la enzima pierda dicha conformación y, por tanto, su actividad. Además, el gran número y diversidad química de los aminoácidos que constituyen la enzima permite varias reacciones químicas cuyo resultado final es una inactivación total o parcial de la enzima (Klibanov, 1979). La enzima puede perder su actividad de forma reversible, por eliminación temporal de algún ión o molécula orgánica que es fundamental para la actividad enzimática, o de forma irreversible. En ciertas condiciones, algunos de los enlaces que obligan a la enzima a tener su conformación activa se rompen, y la enzima se despliega, siendo este proceso reversible. Sin embargo, la enzima desplegada es más

susceptible de reaccionar químicamente y, posteriormente, la enzima puede plegarse en una conformación inactiva, que suele ser irreversible.

Los procesos de inactivación irreversible que se dan en las enzimas pueden ser inter- o intra-moleculares (Klibanov, 1983; Ghatorae y col., 1993). Entre los primeros se encuentran la agregación y la autólisis, mientras que los segundos se provocan por agentes externos, tales como la temperatura, el cambio de pH, la acción de detergentes o de agentes desnaturalizantes, como los metales pesados, o también por fuerzas mecánicas (shear stress), o por otros motivos, como la acción de agentes oxidantes, el enfriamiento, la congelación, las radiaciones, etc.

Las enzimas no escapan de las exigencias técnicas a las que son sometidos los catalizadores en general, de manera que su estabilización constituye uno de los aspectos más importantes para alcanzar una utilización óptima de las mismas en diversos procesos industriales. Una forma de conseguir enzimas más resistentes y reutilizables es la inmovilización.

Si se analiza la aplicación de las enzimas como catalizadores industriales tanto en su forma soluble nativa como en su forma inmovilizada, se pueden observar ciertas ventajas e importantes limitaciones económicas y tecnológicas. En el caso de las enzimas libres:

- Se utilizan directamente sin necesidad de ningún tipo de tratamiento.
- Los reactores pueden ser muy sencillos: tanques operando en discontinuo o "batch", y reactores tubulares y tanques operando en continuo.
- Las enzimas sólo pueden ser usadas en un único ciclo de reacción. En los últimos años, y para ciertas aplicaciones, se pueden recuperar y recircular mediante operaciones costosas de membrana (ultrafiltración, diafiltración).
- El control de la reacción puede llegar a ser complejo.
- La separación final de la enzima de los productos de reacción es, en general, compleja, a veces, inviable.

En general, las desventajas anteriores son más significativas que las ventajas y por ello, en la mayoría de los procesos de gran tonelaje parece más adecuado el uso de enzimas inmovilizadas (Katchalski-Katzir, 1993).

La inmovilización de enzimas se podría definir como cualquier técnica que permita transformar las enzimas en catalizadores re-utilizables y/o adecuados para su uso en reactores continuos. En la literatura científica se han descrito cientos de protocolos de inmovilización de enzimas (Klibanov, 1983; Tischer y col., 1999; Cao y col., 2003; Roy y col., 2004) que se pueden agrupar de un modo simplificado como se indica a continuación:

- Inmovilización reversible por enlace no-covalente:
 - Adsorción física o química reversible a un soporte (matriz, gel, resina)
 - Inclusión
 - Microencapsulación (sol-geles, cápsulas, fibras huecas, etc.)
 - Micelas inversas
- Inmovilización por enlace covalente irreversible:
 - Entrecruzamiento (enzimas solubles agregados, cristales)
 - Incorporación a redes poliméricas
 - Unión covalente a un soporte (matriz, resina, gel)

Los soportes utilizados en la inmovilización de enzimas son muy variados; atendiendo a su composición química se pueden dividir en orgánicos e inorgánicos. Los soportes orgánicos han sido tradicionalmente los más usados y sobre ellos se han probado más enzimas y más métodos que sobre los soportes inorgánicos. Esto es debido a que hay una mayor afinidad natural de los soportes orgánicos, generalmente poliméricos, por las enzimas, dada la relativa similitud química entre ellos.

Los soportes orgánicos admiten mayor carga enzimática, son más fáciles de modificar químicamente para la inmovilización de enzimas, presentan una porosidad adecuada para este fin y suelen ser baratos. Por el contrario,

cabe destacar su tendencia a cambiar de tamaño, su compresibilidad y su tendencia a ser fuente de carbono de microorganismos invasores.

Teniendo como objetivo predecir la vida útil de un biocatalizador para poder diseñar la operación de un reactor en condiciones de desactivación enzimática, se han propuesto varios modelos cinéticos a partir de mecanismos de desactivación (Lencki y col., 1992, 1992). El desarrollo teórico de la desactivación enzimática considera dos posibilidades en los mecanismos de desactivación, que sea lineal y afectada por la formación de una especie intermedia o no lineal, considerando un grupo de sustancias intermedias.

Los mecanismos lineales de desactivación consideran que una conformación de la enzima se transforma en otra siguiendo una reacción de orden uno, irreversible o reversible, lo cuál es válido para muchas enzimas. Estos mecanismos incluyen fenómenos como la disociación de subunidades, la desnaturalización, la descomposición química, la agregación y la coagulación. De todos ellos, sólo la coagulación o agregación en la que se forman enlaces covalentes entre las unidades de enzima da lugar a enzimas irreversiblemente inactivas.

La desactivación lineal de las enzimas puede representarse por reacciones simples de orden 1 o por reacciones complejas, cada paso de los cuales también puede ser de orden 1. Dentro de estas últimas, se distingue entre desactivación en serie y en paralelo.

En los modelos cinéticos en los que existe más de una configuración activa de la enzima, la constante o constantes β relacionan la actividad de las especies enzimáticas activas. Así, se puede considerar que el valor de esta constante para la enzima a tiempo cero es la unidad, pues todas las actividades se refieren a la actividad de la enzima a tiempo cero.

1.5.2. La lipasa B de *Candida antarctica*

Con el objeto de encontrar enzimas con propiedades extremas, se aisló la cepa *Candida antarctica* de una muestra de la Antártida. Este organismo produce dos lipasas que se denominan A y B. La estructura de la CALB (lipasa

B de *Candida antarctica*), que se muestra en la Figura 1.8, fue determinada por cristalografía de rayos-X en 1994 (Uppenberg y col., 1994; Uppenberg y col., 1994). Está compuesta por 317 aminoácidos y tiene un peso molecular de 33 kDa, lo que la convierte en una proteína bastante pequeña en comparación con otras lipasas.

Como todas las lipasas de estructura conocida, pertenece a la familia de proteínas de las hidrolasas α/β . Tiene la particularidad, al contrario que casi la totalidad de las lipasas, de no presentar activación interfacial, es decir, que su actividad no se incrementa por exposición a una interfase agua-lípido. Esto se debe al hecho de que la enzima carece de la especie de tapa que regula el acceso al centro activo, una característica común en otras lipasas. Otra característica inusual de esta lipasa es que no comparte la secuencia de aminoácidos GX SXG alrededor del aminoácido principal del centro activo, la serina: la CALB presenta una treonina en la posición de la primera glicina. De manera similar a otras serin-hidrolasas, una tríada catalítica serina-histidina-aspartato es la responsable de la acción catalítica, según el mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, que se esquematiza en la Figura 1.6. Este mecanismo tiene lugar en dos pasos, uno de acilación y otro de desacilación separados por un intermedio covalente acil-enzima.

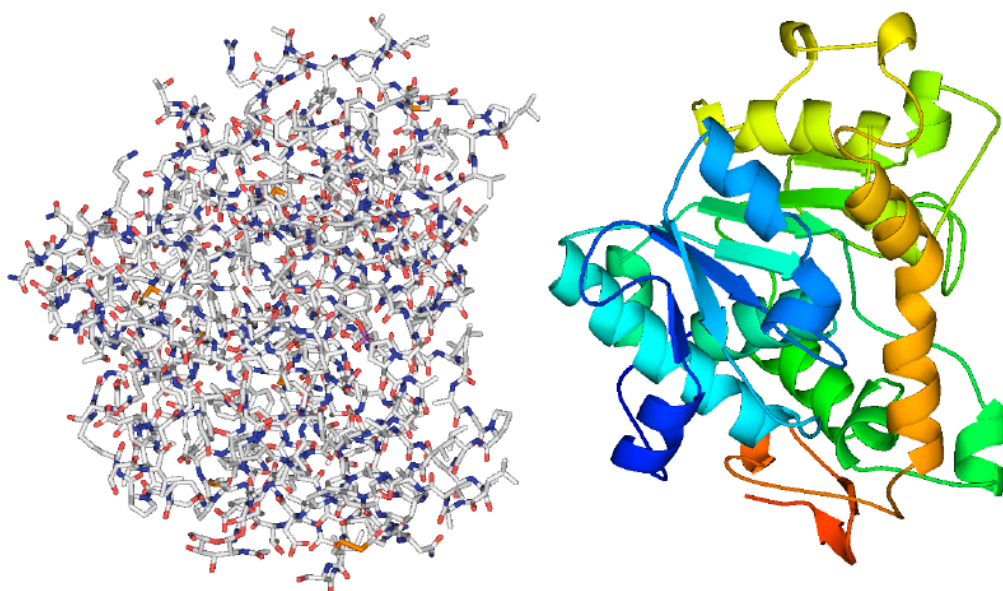


Figura 1.8. Representación esquemática de la lipasa B de *Candida antarctica*. A la izquierda: estructura de CALB con la secuencia de aminoácidos. A la derecha: visualización de estructura secundaria (hélices- α y láminas- β) y terciaria (conformación final de la CALB libre)

La no necesidad de activación interfacial de la CALB permite su aplicación como catalizador en sistemas homogéneos, como es el caso de este trabajo. Además, la inmovilización de la enzima permite su estabilización y reutilización, haciéndola más interesante para su aplicación a nivel industrial como catalizador de síntesis.

El inmovilizado comercial de uso más extendido es Novozyme® 435 producido por Novo Nordisk. Se trata de un derivado preparado por adsorción física de la enzima en una resina macroporosa de metil-metacrilato (Lewatit VP OC 1600). Se distribuye a modo de cáscara en la superficie de las partículas esféricas y tiene una carga de enzima, prácticamente pura, de 10% en peso y con una superficie específica de 130 m²/g y un diámetro de poro promedio de 15 nm (Mei, 2003). Este derivado enzimático comercial se describe con detalle más adelante, en el Capítulo 4 de esta Memoria.

Existen algunos trabajos que estudian la estabilidad de varias lipasas inmovilizadas en soportes muy variados (Villeneuve y col., 2000). También existen publicaciones tratando la estabilidad de CALB y Novozyme 435 en varios medios de reacción, especialmente disolventes orgánicos, como tolueno (Törnvall y col., 2007), o incluso fluidos supercríticos (Dijkstra y col., 2007). Sin embargo, no se ha realizado un estudio cinético riguroso de reacciones de esterificación y de la desactivación del biocatalizador utilizado en el presente trabajo.

1.6. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

La presente Tesis Doctoral estudia la esterificación de glicerina con ácido benzoico y ácido p-metoxicinámico, ambas reacciones catalizadas por la enzima lipasa B de *Candida antarctica*, en condiciones tales que uno de los reactivos, el glicerol, actúa también como disolvente. Se busca la producción del mono-éster extremo de la glicerina, con aplicaciones interesantes para las industrias farmacéutica y cosmética, entre otras.

En primer lugar, se establecerá un procedimiento experimental para la obtención de datos experimentales reproducibles. Se diseñará, montará y pondrá en marcha una instalación experimental, así como un procedimiento de operación y recogida de muestras y se desarrollarán los métodos analíticos que por aplicación de varias técnicas permitan el seguimiento de la evolución del sistema reaccionante, así como la evaluación de las propiedades de los productos obtenidos. Se utilizará tanto la enzima libre comercial, como un preparado, también comercial, de la enzima inmovilizada.

Para estudiar la síntesis del mono-benzoato de glicerina en sistemas homogéneos y heterogéneos y determinar la cinética de dichos procesos, una vez se ha seleccionado la lipasa más activa para la síntesis del mono-glicérido, se estudiará primero el sistema catalizado por la enzima en disolución, sistema homogéneo, y, posteriormente, catalizado por la misma enzima inmovilizada sobre una resina de intercambio iónico, utilizando el derivado comercial Novozym®435, en un sistema heterogéneo. En cada caso, se estudiará el efecto de las variables que afectan a la velocidad global del proceso: concentración de reactivos, temperatura y velocidad de agitación, buscando que las condiciones de operación sean óptimas tanto para la producción del mono-glicérido como para la estabilidad del biocatalizador. Por un lado, para la enzima libre y en base al mecanismo a través del cual tiene lugar el proceso de esterificación, se determinará un modelo cinético que tenga en consideración la influencia de la concentración de cada uno de los reactivos, la temperatura y la desactivación térmica y química que puede sufrir el catalizador. Se aplicará una metodología similar para el sistema heterogéneo, donde, además de las anteriores variables, se estudiará la influencia de las limitaciones al transporte en la velocidad de la esterificación. Una cuestión poco estudiada en estos procesos enzimáticos en fase orgánica, es el efecto del agua, necesaria siempre en una pequeña cantidad; en este caso, se tratará de modificar favorablemente las propiedades del medio, analizando la acción de la mezcla con un determinado contenido de agua.

En segundo lugar, y con objeto de conocer la síntesis enzimática del mono-éster de ácido p-metoxicinámico usando lipasas inmovilizadas y las

características del producto obtenido, se estudiará la influencia de las variables ya citadas en este proceso y se determinará un modelo cinético que sea capaz de explicar el efecto de dichas variables sobre la velocidad de reacción. Para concluir, se realizará la caracterización de los productos obtenidos, teniendo en mente su posible utilización como protector UV, midiendo parámetros como la relación de hidrofiliidad a hidrofobicidad (coeficiente de reparto octanol/agua), el factor de protección solar (SPF) y la fotoestabilidad, parámetros importantes para su aplicación como ingrediente en cremas solares.

1.7. BIBLIOGRAFÍA

- Antczak, T.; J. Patura; M. Szczesna-Antczak; D. Hiler y S. Bielecki (2004). "Sugar ester synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **29**(1–6): 155-161.
- Balasundram, N.; K. Sundram y S. Samman (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food Chemistry* **99**(1): 191-203.
- Batovska, D. I.; T. Kishimoto; V. S. Bankova; Z. G. Kamenarska y M. Ubukata (2005). "Synthesis of some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu protocol." *Molecules* **10**(3): 552-558.
- Baumann, H.; B. Fochem; F. Hirsinger; H. Zoebelein y J. Falbe (1988). *Angewandte Chemie International Edition* **27**(1): 41-62.
- Biofuels Platform. (2012). "Production of biofuels in the world in 2009." Retrieved 9/02/2012, from <http://www.biofuels-platform.ch>.
- Bonda, C. A. (2001). "Stable sunscreen composition containing a barium compound, e.g., barium sulfate, a dibenzoylmethane derivative, e.g., butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzone), and a methoxycinnamate derivative, e.g., octyl methoxycinnamate". US. **09/592026**
- Bornscheuer, U. T.; C. Bessler; R. Srinivas y S. Hari Krishna (2002). "Optimizing lipases and related enzymes for efficient application." *Trends in Biotechnology* **20**(10): 433-437.
- Boussouira, B. y D. Candau (2002). "Composition comprising a cinnamic acid derivative and a polyamino polymer". US. **09/703930**.
- Brewster, P. (1987). "Glycerol esters as Fuel Economy Additives". US. **4,683,069**.
- Buchholz, K.; V. Kasche y U. T. Bornscheuer (2012). "Biocatalysts and enzyme technology", John Wiley & Sons.
- Cao, L.; U. T. Bornscheuer y R. D. Schmid (1999). "Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**(3): 279-285.
- Cao, L.; L. v. Langen y R. A. Sheldon (2003). "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?" *Current Opinion in Biotechnology* **14**(4): 387-394.
- Ciriminna, R.; G. Palmisano; C. D. Pina; M. Rossi y M. Pagliaro (2006). "One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA." *Tetrahedron Lett.* **47**(39):6993-6995: .
- Cheng, N.-S. (2008). "Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **47**(9): 3285-3288.
- Chun-Hui, C.; J. Beltramini y F. Yong-Xian (2008). "Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals." *Chemical Society reviews* **37**(3): 527-549.
- Davidson, P. M.; J. N. Sofos y A. L. Branen (2005). "Antimicrobials in Food", CRC Press.
- De Freitas, Z.; E. Pereira dos Santos; J. Ferreira da Rocha; G. M. Dellamora-Ortiz y J. Saraiva Goncalves (2005). "A new sunscreen of the cinnamate class: Synthesis and

enzymatic hydrolysis evaluation of glyceryl esters of p-methoxycinnamic acid." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **25**(1): 67-72.

De Gracia, M. (2009). "Esterificación de Colofonia con Glicerina: Estudio Cinético y Fenomenológico.", Universidad Complutense de Madrid.

Demirbas, A. y M. F. Demirbas (2010). "Algae as a new source of biodiesel". London, Springer.

Dijkstra, Z. J.; R. Merchant y J. T. F. Keurentjes (2007). "Stability and activity of enzyme aggregates of Calb in supercritical CO₂." *The Journal of Supercritical Fluids* **41**(1): 102-108.

European Biodiesel Board. (2010). "2009-2010: EU biodiesel industry restrained growth in challenging times." from www.ebb-eu.org.

Fan, X.; R. Burton y Y. Zhou (2010). "Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals – Mini Review." *The Open Fuels & Energy Science Journal* **3**: 17-22.

Figueroa, M. C. y P. Villeneuve (2005). "Phenolic acids enzymatic lipophilization." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(8): 2779-2787.

Gaspar, A.; E. M. Garrido; M. Esteves; E. Quezada; N. Milhazes; J. Garrido y F. Borges (2009). "New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives." *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**: 2092-2099.

Ghatorae, A. S.; M. J. Guerra; G. Bell y P. J. Halling (1993). "New technique for monitoring interfacial inactivation of enzymes by organic solvents". *Studies in Organic Chemistry*. A. H. W.J.J. van den Tweel and R. M. Buitelaar, Elsevier. **Volume 47**: 329-336.

Gonzalez, H. (2006). "Studies of Sunscreens: Percutaneous Absorption of Benzophenone-3 and Photostability", The Sahlgrenska Academy at Göteborg University.

Hari Krishna, S. y N. G. Karanth (2001). "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547**(2): 262-267.

Holser, R.; T. Mitchell; R. Harry-O'kuru; S. Vaughn; E. Walter y D. Himmelsbach (2008). "Preparation and Characterization of 4-Methoxy Cinnamoyl Glycerol." *Journal of the American Oil Chemists Society* **85**(4): 347-351.

Holser, R. A. (2008). "Kinetics of Cinnamoyl Glycerol Formation." *Journal of the American Oil Chemists Society* **85**: 221-225.

Jaeger, K.-E. y M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." *Trends in Biotechnology* **16**(9): 396-403.

Jarvis, G. N.; E. R. Moore y J. H. Thiele (1997). "Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *klebsiella planticola* strain isolated from red deer." *Journal of Applied Microbiology* **83**: 166-174.

Katchalski-Katzir, E. (1993). "Immobilized enzymes — learning from past successes and failures." *Trends in Biotechnology* **11**(11): 471-478.

Klibanov, A. M. (1979). "Enzyme stabilization by immobilization." *Analytical Biochemistry* **93**(0): 1-25.

Klibanov, A. M. (1983). "Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation". *Advances in Applied Microbiology*. I. L. Allen, Academic Press. **Volume 29**: 1-28.

- Ladero, M.; M. De Gracia; J. Tamayo; I. Lopez de Ahumada; F. Trujillo y F. García-Ochoa (2011). "Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: Application to industrial operation." *Chemical Engineering Journal* **169**: 319-328.
- Langner, R. (2009). "Mixtures of Ethylhexyl P-methoxycinnamate and Ethylhexyl Salicylate ". US. **20090053154**.
- Laranjinha, J.; L. M. Almeida y V. M. C. Madeira (1995). "Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acids derivatives of cinnamic acid." *Free Radical Biology and Medicine* **19**: 329-337.
- Larissegger-Schnell, B.; S. M. Glueck; W. Kroutil y K. Faber (2006). "Enantio-complementary deracemization of (\pm)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and (\pm)-3-phenyllactic acid using lipase-catalyzed kinetic resolution combined with biocatalytic racemization." *Tetrahedron* **62**(12): 2912-2916.
- Lencki, R. W.; J. Arul y R. J. Neufeld (1992). "Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation, and decomposition on enzyme inactivation kinetics: I. First-order behaviour." *Biotechnology and Bioengineering* **40**(11): 1421-1426.
- Lencki, R. W.; J. Arul y R. J. Neufeld (1992). "Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation, and decomposition on enzyme inactivation kinetics: II. Biphasic and grace period behavior." *Biotechnology and Bioengineering* **40**(11): 1427-1434.
- Liese, A. y M. Villela Filho (1999). "Production of fine chemicals using biocatalysis." *Current Opinion in Biotechnology* **10**(6): 595-603.
- Mank, A. P. J.; J. P. Ward y D. A. Van Dorp (1976). "A versatile, flexible synthesis of 1,3-diglycerides and triglycerides." *Chemistry and Physics of Lipids* **16**(2): 107-114.
- Mezzetti, A.; C. Keith y R. J. Kazlauskas (2003). "Highly enantioselective kinetic resolution of primary alcohols of the type Ph-X-CH(CH₃)-CH₂OH by Pseudomonas cepacia lipase: effect of acyl chain length and solvent." *Tetrahedron: Asymmetry* **14**(24): 3917-3924.
- Miller Klein Assoc. (2006). "Impact of Biodiesel Production on the Glycerol Market", Miller Klein Associates.
- Molinero, L. (2012). "Producción de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácidos cinámico y metoxicinámico". Tesis, Universidad Complutense de Madrid.
- Nemeth, A. y B. Sevilla (2008). "Development of a new bioprocess for production of 1,3-propanediol I.: modeling of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol with klebsiella pneumoniae enzymes." *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **144**(1): 47-58.
- Norhasyimi, R.; A. Ahmad Zuhairi y M. Abdul Rahman (2010). "Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(3): 987-1000
- Oberhauser, T.; K. Faber y H. Griengl (1989). "A substrate model for the enzymatic resolution of esters of bicyclic alcohols by candida cylindracea lipase." *Tetrahedron* **45**(6): 1679-1682.
- Ogliaruso, M. y J. Wolfe, Eds. (2010). "The synthesis of carboxylic acids and esters and their derivatives, in Acid Derivatives". Jerusalem, The Hebrew University.
- Otera, J. y J. Nishikido, Eds. (2010). "Esterification. Methods, Reactions, and Applications", Wiley-VCH
- Ottosson, J. y T. h. i. S. I. f. bioteknologi (2001). "Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis: A Study of Lipase Enantioselectivity", Tekniska högsk.

- Pagliari, M.; R. Ciriminna; H. Kimura; M. Rossi y C. Della Pina (2007). "From Glycerol to Value-Added Products." *Angewandte Chemie International Edition* **46**(24): 4434-4440.
- Pagliari, M.; R. Ciriminna; H. Kimura; M. Rossi y C. Della Pina (2007). "From Glycerol to Value-Added Products", WILEY-VCH Verlag. **46**: 4434-4440.
- Pagliari, M. y M. Rossi (2008). "The future of glycerol." *Focus on Catalysts* **2008**(6): 8-8.
- Pagliari, M. y M. Rossi, Eds. (2008). "The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material". RSC Green Chemistry Book Series. Cambridge, UK, RSC Publishing.
- Petkar, S. A. y B. Gogte (2008). "Novel Sorbitol Resin based Polymeric Surfactant for Liquid Detergent." *Chemical Engineering World* **43**(2): 84-87.
- Plou, F. J.; M. A. Cruces; M. Ferrer; G. Fuentes; E. Pastor; M. Bernabé; M. Christensen; F. Comelles; J. L. Parra y A. Ballesteros (2002). "Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent." *Journal of Biotechnology* **96**(1): 55-66.
- Roy, I. y M. N. Gupta (2004). "Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads." *Enzyme and Microbial Technology* **34**(1): 26-32.
- Sanchez, M. (2008). "Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en media acuosa y no acuosa.". Tesis, Universidad Complutense de Madrid.
- Santus, G.; L. Barberi y C. Schubert (2009). "Esters of Glycerol and their uses in cosmetic and pharmaceutical applications". **WO 2009/056275 A1**.
- Sarrouh, B.; T. Marcos Santos; A. Miyoshi; R. Dias y V. Azevedo (2012). "Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market." *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* **4**.
- Scientific Committee on Consumer Products (2005). "Benzoic Acid and Sodium Benzoate". European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General.
- Sharma, R.; Y. Chisti y U. C. Banerjee (2001). "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnology Advances* **19**(8): 627-662.
- Shigeru, M. (2003). "Process for preparation of benzoic acid glycerine esters as plasticizers". Japan. **JP 2003055311 (A)**: 7 pp.
- Soltes, E. J. y D. F. Zinkel (1989). "Chemistry of Rosin".
- Tarahomjoo, S. y I. Alemzadeh (2003). "Surfactant production by an enzymatic method." *Enzyme and Microbial Technology* **33**(1): 33-37.
- Tischer, W. y V. Kasche (1999). "Immobilized enzymes: crystals or carriers?" *Trends in Biotechnology* **17**(8): 326-335.
- Törnvall, U.; C. Orellana-Coca; R. Hatti-Kaul y D. Adlercreutz (2007). "Stability of immobilized *Candida antarctica* lipase B during chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids." *Enzyme and Microbial Technology* **40**(3): 447-451.
- Torres y Carrera (2010). "Informe Biocombustibles 2010", Torres y Carrera consultores de comunicación. <http://www.torresycarrera.com/>.
- Tyson, K. S.; J. Bozell; R. Wallace; E. Petersen y L. Moens (2004). "Biomass Oil Analysis: Research Needs and Recommendations". Colorado, National Renewable Energy Laboratory: 116
- U.S. Soybean Export Council (2007). "Glycerin Market Analysis". Indianapolis, ABG.

Uppenberg, J.; M. T. Hansen; S. Patkar y T. A. Jones (1994). "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*." *Structure* **2**(4): 293-308.

Uppenberg, J.; S. Patkar; T. Bergfors y T. A. Jones (1994). "Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*." *Journal of Molecular Biology* **235**(2): 790-792.

Urtiaga, A.; E. D. Gorri y C. Casado (2003). "Pervaporative Dehydration of Industrial Solvents Using a Zeolite NaO Commercial Membrane." *Separation and Purification Technology* **32**: 207-213.

Villeneuve, P.; J. M. Muderhwa; J. Graille y M. J. Haas (2000). "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9**(4-6): 113-148.

Wang, S. (2007). "Synthesis of light-colored Rosin Glycerol Ester." *Holzforschung* **61**(5): 499-503.

Yahya, A. R. M.; W. A. Anderson y M. Moo-Young (1998). "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions." *Enzyme and Microbial Technology* **23**(7-8): 438-450.

Zhou C-H., B. J. N., Fan Y-X. y Lu G. Q (2008). "Chemoselective catalytic conversión of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals." *Chem. Soc. Rev.* **Vol. 37**: 527-549.

2.- Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo recoge los equipos, materiales y procedimientos utilizados para la realización del trabajo descrito en esta memoria. Se han organizado en función de la etapa del estudio a la que correspondan, sea ésta la reacción química, el análisis químico para su seguimiento o la caracterización del producto de interés, tanto de forma química como respecto a sus propiedades en su aplicación. Así mismo, se describen los diferentes métodos experimentales, de análisis y de interpretación utilizados.

2.1. MATERIALES

En las Tablas 2.1 a 2.4 se recogen las enzimas y los materiales empleados en los ensayos de hidrólisis y síntesis enzimática y en la inmovilización de la isoenzima B de *Candida antarctica* (CALB). Varios de ellos fueron amablemente donados por Novozymes Inc. y Lanxess GmbH.

Tabla 2.1. Enzimas industriales estudiadas

Producto	Pureza	Suministrador
Lypozyme® CALB L	80 % (electroforesis)	Novozymes
Novozyme® 435	90 % (electroforesis)	Novozymes
AY30	-	Acros
TLIM	-	Novozymes

Tabla 2.2. Sustratos para las reacciones de hidrólisis y síntesis enzimática

Producto	Pureza	Suministrador
p-nitrofenilbutirato (PNPB)	>98,8 %	Fluka
Ácido benzoico	99%	Aldrich
Ácido p-metoxicinámico	99%	Aldrich
Glicerina	>99,8 %	Fisher
Benzoato de metilo	>99%	Aldrich
Acetonitrilo	99,9 % (HPLC)	SDS

Tabla 2.3. Soportes y reactivos para la inmovilización de enzimas

Producto	Pureza	Suministrador
Agarosa-octil-4BCL	-	GE Healthcare
Agarosa-6-BCL	-	GE Healthcare
Lewatit VPOC 1600	-	Lanxess
Lewatit CNP105	-	Lanxess
Hidróxido sódico	99%	Sigma
Glicidol	98%	Sigma
Peryodato sódico	99%	Sigma
Etilendiamina	98%	Sigma
Borohidruro sódico	99%	Sigma
Triton X-100	98%	Dow Europa
Carbodiimida	98%	Sigma

Tabla 2.4. Eluyentes de HPLC y otros reactivos y materiales utilizados

Producto	Pureza	Suministrador
Acetonitrilo	99% (HPLC)	Scharlau
Metanol	99% (HPLC)	Scharlau
Dihidrógenofosfato de potasio	98%	Panreac
Monohidrógenofosfato de potasio	98%	Panreac
Tamiz molecular 4 Å Partículas de 2-3 mm de diámetro	-	Scharlau

2.2. EQUIPOS

2.2.1. Instalación experimental

Para los experimentos de esterificación de glicerina con los ácidos benzoico (B) y p-metoxicinámico (M) se ha utilizado una instalación que consiste en un reactor discontinuo isoterma agitado magnéticamente, cuya fotografía se muestra en la Figura 2.1. Consiste en un vaso de cristal con fondo redondeado y agitación con disco de teflón, combinación que impide la abrasión de los biocatalizadores heterogéneos, evitando así comportamientos erráticos debido a fenómenos de desactivación, lixiviación, etc. El vaso está sumergido en un baño de glicerina (IKA Yellow Line, modelo MSC basic C). Su temperatura es medida con una sonda de platino que está, a su vez, acoplada a un controlador de temperatura (IKA, modelo TC3). La velocidad de agitación también se puede regular y mantener controlada en el valor de consigna.



Figura 2.1. Instalación experimental para experimentos de esterificación

2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La evolución temporal del sistema en los experimentos realizados para el estudio de las diferentes reacciones de esterificación se ha seguido por medio del análisis por HPLC de fase reversa de muestras obtenidas a lo largo de cada experimento. Esta técnica tiene como fundamento la separación de los componentes de la mezcla por la mayor o menor afinidad que tenga una especie por la fase estacionaria de una columna (de carácter hidrofóbico) y por la fase móvil (eluyente polar en esta técnica) que esté circulando por el sistema. Los compuestos, separados, pasan por un detector, registrándose su aparición como picos en un cromatograma.

El equipo utilizado es un HPLC de marca JASCO (serie LC-2000), que se muestra en la Figura 2.2, consta de los siguientes elementos, conectados secuencialmente según el siguiente orden:

- Bomba de gradiente de baja presión de cuatro vías con desgasificación de eluyentes por vacío, de referencia Jasco modelo PU – 2089.
- Automuestreador: en este elemento robotizado, refrigerado y de 120 posiciones, de referencia AS modelo 2059 de la firma comercial Jasco, se introducen los viales que contienen la muestra a analizar.
- Termostato Jasco CO – 2065 para alojar la columna y atemperarla.
- Detector de espectrofotometría UV-vis “diode array” modelo Jasco MD 2015 para detección por absorción en el espectro ultravioleta-visible.



Figura 2.2. Cromatógrafo HPLC tipo modular serie LC-2000 de Jasco

2.2.3. Cromatografía líquida HPLC/Espectrómetro de Masas

Como medio para la identificación de los compuestos generados en el transcurso de los experimentos de esterificación, se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplada a un Espectrómetro de Masas de trampa de iones Bruker modelo Esquire-LC. Este detector está acoplado al equipo de cromatografía por medio de un inyector de electrospray (ESI) para una aplicación en un rango de masa de 50-6000 uma. Este estudio se ha realizado en el C.A.I. de Espectrometría de Masas de la Universidad Complutense de Madrid.

2.2.4. Resonancia magnética nuclear (NMR)

Para la comprobación de la estructura química de los productos obtenidos en las reacciones de esterificación se ha utilizado un equipo de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) BRUKER AVANCE DPX 300MHz-BACS60 del C.A.I. de Resonancia Magnética Nuclear y de Spin Electrónico de la Universidad Complutense de Madrid.

Este aparato permite hacer análisis de resonancia mono- y bidimensionales; está dotado con los accesorios necesarios para llevar a cabo los espectros a temperatura variable, con un rango de +150°C a - 60°C, en función de los disolventes y de las muestras. Está equipado con una sonda QNP 5mm: ^1H / ^{13}C / ^{19}F / ^{31}P , con gradientes en Z y con un inyector automático (BACS60).

2.2.5. Espectrofotometría UV-Vis

La estructura de un compuesto determina sus propiedades de absorción si éste es irradiado con radiación electromagnética, y este comportamiento es propio de cada especie. El espectrofotómetro, por medio de la lectura del valor de absorbancia de un compuesto objetivo a una determinada longitud de onda, permite obtener una respuesta rápida de análisis en una muestra problema. Es, por esta razón, el equipo elegido para la medida de la actividad enzimática por medio de un ensayo de hidrólisis, como se explica más adelante en el punto

2.3.2.2. También tiene la opción de realizar espectros, es decir, la medida de la absorbancia a lo ancho de un intervalo de valores de longitud de onda determinado, característica que se puede aprovechar para la medida de actividad de filtro UV como se explica en el punto 2.3.4.1.

El espectrofotómetro utilizado en la realización de este trabajo (Jasco V-630), de doble haz, dispone de dos lámparas (una de deuterio o ultravioleta y una halógena de tungsteno para el espectro de visible) que permiten su utilización en una banda del espectro electromagnético que va de 190 a 1100 nm (UV-Visible) con una anchura de la banda espectral de 2 nm. La celda de medida dispone de una camisa termostática que se puede acoplar por medio de conexiones a un baño de agua y un sistema de agitación magnética de velocidad regulable para la celda, para asegurar la precisión de los resultados. Por medio del software (Spectra Manager II), además, permite el registro en continuo de los valores de absorbancia, de manera que se puede seguir la evolución de una reacción, y determinar velocidades de variación de concentración para el estudio de la actividad catalítica de las enzimas estudiadas, o de su desactivación, según el caso.

Por otro lado, el registro de los espectros se puede utilizar también para evaluar la actividad como filtro ultravioleta de los compuestos por medio de la determinación o cálculo del “factor de protección solar” o SPF, como se explica en el apartado 2.3.4.1.

2.2.6. Simulador solar

Con el objeto de estudiar la degradación de las propiedades como filtro UV de los glicéridos del ácido p-metoxicinámico, como consecuencia de su exposición al sol, es decir, simulando condiciones de uso, se somete a una muestra a la radiación de una lámpara (modelo HQI-R-250W), cuyo espectro, similar a la radiación solar, se muestra en la Figura 2.3.

Para poder llevar a cabo esta parte del estudio se colaboró con la Unidad de Energía Solar Fotovoltaica del Centro de investigaciones energéticas, medioambientales y tecnológicas (CIEMAT).

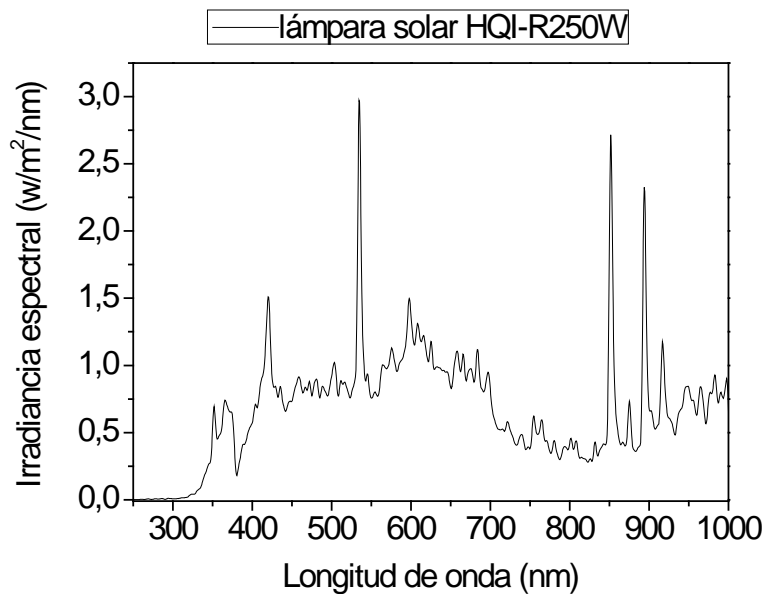


Figura 2.3. Espectro de radiación de la lámpara de simulación de radiación solar HQI-R250W

2.2.7. Analizador de área superficial y tamaño de poro

Para la caracterización de los soportes de las enzimas inmovilizadas se ha utilizado un analizador de área superficial y tamaño de poro Coulter™, modelo SA 3100™. Las medidas se fundamentan en la adsorción isoterma de un compuesto cuyas moléculas tienen un tamaño conocido, en este caso nitrógeno, sobre una superficie problema. El proceso de adsorción se sigue a través de variaciones de presión del nitrógeno que se registran para los cálculos posteriores.

El modelo o aproximación BET, por ejemplo, permite el cálculo del área superficial mientras que el método BJH permite determinar la distribución de tamaño de poro por desorción del nitrógeno previamente adsorbido.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Desarrollo de un experimento de esterificación

Los experimentos de síntesis de monoglicérido de ácido benzoico y p-metoxicinámico se han realizado en la instalación descrita en el punto 2.2.1.

Para ello, se llevan a cabo dichos experimentos en un vaso de precipitados de fondo redondo, añadiendo el peso adecuado de ácido para alcanzar la concentración deseada (20-100 g/L) a 20 ml de glicerina pura; después se lleva a un baño de glicerina, que mantiene la temperatura constante y controlada (50-80°C), agitando el contenido del vaso para facilitar la disolución del ácido y termostatar la mezcla de reacción. Una vez disuelto el ácido, se da inicio a la reacción por adición del derivado enzimático objeto de prueba.

Las muestras tomadas a lo largo de la transformación se congelan y se diluyen en una disolución 10 g/L de benzoato de metilo (patrón interno) en metanol para los experimentos con ácido benzoico y metanol puro para el caso del ácido p-metoxicinámico. Se filtran mediante un microfiltro de teflón de 0,5 µm de luz (Advantec, modelo DISMIC-13 JP) antes de analizarse por cromatografía líquida, HPLC, según el método que se describe en el punto 2.3.2.1. Antes del análisis, se diluyen las muestras en isopropanol.

2.3.2. Métodos de análisis

2.3.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En este trabajo se ha aplicado la técnica de cromatografía líquida de fase reversa. La separación de la mezcla se basa en la polaridad de los componentes de la mezcla de reacción, que, al ser diferente, supone una interacción distinta de cada analito con la fase estacionaria apolar (columna Mediterránea Sea-18 de Teknokroma) y con la fase móvil relativamente polar (mezcla 55:45 v/v metanol: solución acuosa de ácido sulfúrico pH 2,2), que fluye de forma isocrática con un caudal de 0,8 ml/min. La temperatura de la columna se mantiene constante en 50°C.

Se mide la absorbancia a $\lambda = 254$ nm (un mínimo local del espectro de los ácidos) de los diferentes compuestos a su paso por el detector, obteniéndose un cromatograma que registra los picos de los analitos, determinando el tiempo de retención y el área de pico de cada compuesto. El área de pico de cada compuesto es el valor que se utiliza para calcular su concentración mediante el calibrado realizado previamente.

En la Figura 2.4 se muestra un cromatograma correspondiente a una muestra a 8 horas de reacción obtenida en un experimento de esterificación de ácido benzoico y glicerina en las condiciones que se muestran en el pie de figura; se puede observar la presencia de un doble pico que eluye hacia los seis minutos y de otro pico que eluye en torno a los ocho minutos, además del pico a 14-15 minutos que corresponde al patrón interno, el benzoato de metilo. El primer pico se relaciona con los dos monoglicéridos que se pueden obtener en esta reacción, mientras que el segundo, a los ocho minutos, corresponde al ácido benzoico. La Figura 2.5 muestra un cromatograma clásico de la esterificación de glicerina y ácido p-metoxicinámico. En este caso, el primer pico, a siete minutos, es el del monoglicérido terminal de dicho ácido, mientras que el segundo (a 9 minutos) corresponde al ácido. De nuevo, el último pico es el del patrón interno, el benzoato de metilo.

El avance de la reacción se sigue por la desaparición del ácido benzoico y metoxicinámico, aplicando una ecuación del calibrado (Ecuaciones [2.1] y [2.2]) y se expresa en términos de conversión, según la ecuación [2.3]. La Figura 2.6 muestra la recta de calibrado del ácido benzoico, mientras que el calibrado para el ácido p-metoxicinámico se representa en la Figura 2.7. Por estequiometría y ante la inexistencia de otros productos, la conversión a monoglicérido se corresponde con la de ácido en relación uno a uno, y se puede determinar así su concentración, de acuerdo a la ecuación [2.4].

$$C_B \left(\frac{mol}{L} \right) = 0,0761 * \frac{A_B}{A_{BMet}} * F_L \quad ; r^2 = 0,9988 \quad [2.1]$$

$$C_M \left(\frac{mol}{L} \right) = 0,2203 * \frac{A_M}{A_{BMet}} * F_L \quad ; r^2 = 0,9828 \quad [2.2]$$

$$X_i = \frac{C_{i,t=0} - C_{i,t=t}}{C_{i,t=0}} \quad ; \text{donde } i = B \text{ ó } M \quad [2.3]$$

$$X_j = 1 - X_i = \frac{C_{j,t=t}}{C_{i,t=0}} \quad ; \text{donde } j = BG \text{ ó } MG \quad [2.4]$$

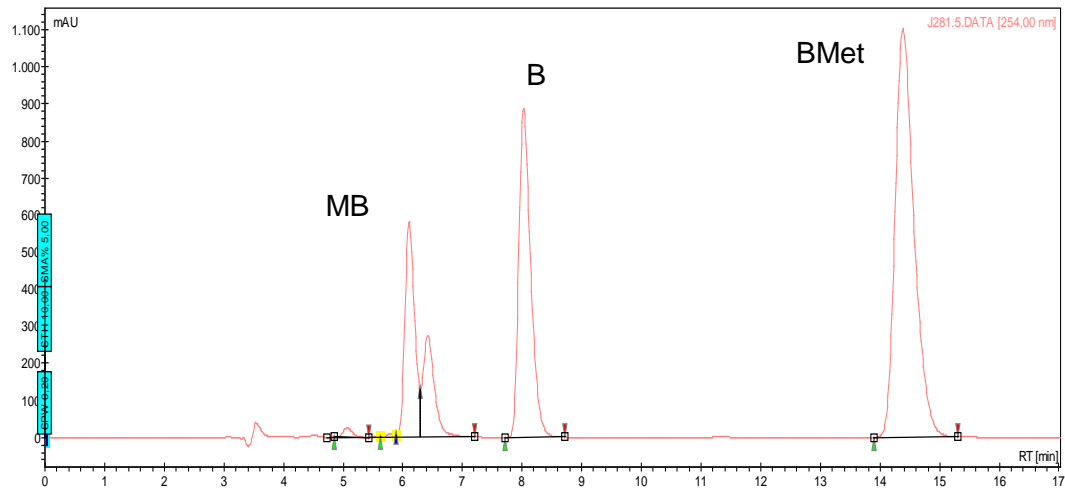


Figura 2.4. Cromatograma típico de un experimento de esterificación de ácido benzoico y glicerina catalizada por CALBL ($C_{B,0} = 30\text{g/L}$; $T = 60^\circ\text{C}$; $t = 8\text{h}$)

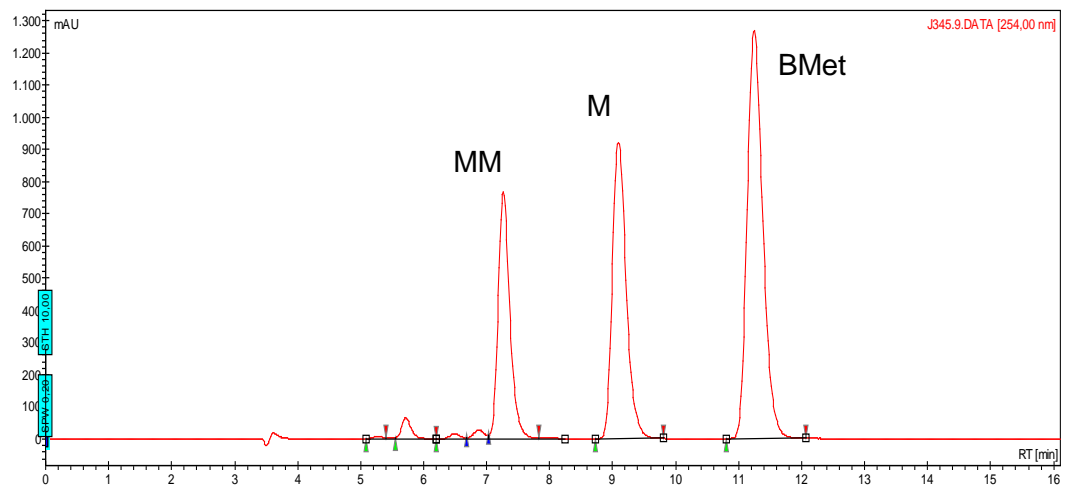


Figura 2.5. Cromatograma típico de un experimento de esterificación de ácido p-metoxicinámico y glicerina catalizada con CALBL ($CM,0 = 20\text{g/L}$; $T = 60^\circ\text{C}$; $t = 26,6\text{h}$).

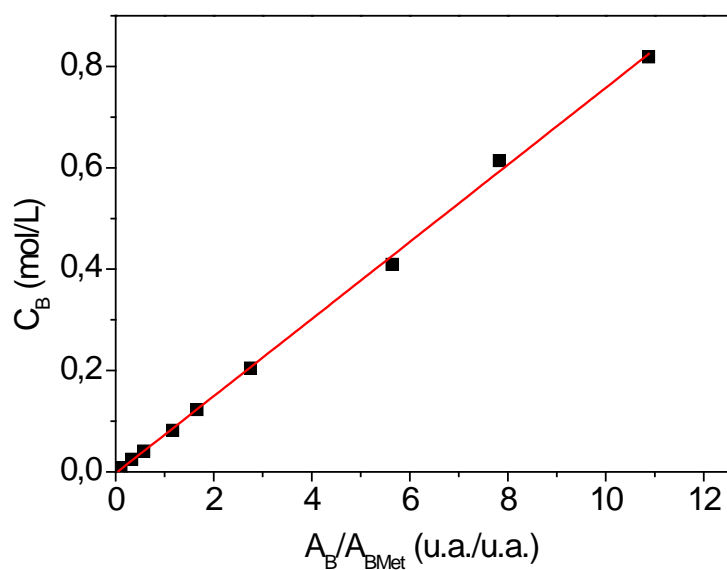


Figura 2.6. Calibrado de ácido benzoico por análisis HPLC (patrón interno: benzoato de metilo 10g/L)

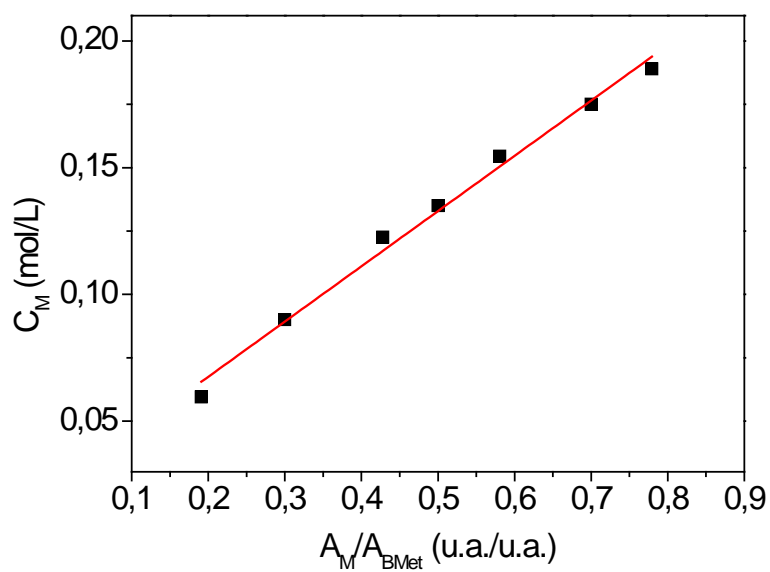


Figura 2.7. Calibrado de ácido metoxicinámico por análisis HPLC (patrón interno: benzoato de metilo 10g/L)

2.3.2.2. Actividad y estabilidad enzimática

Para la medida de la actividad enzimática, así como para los experimentos de desactivación térmica, se ha utilizado la medida de la actividad hidrolítica de la enzima lipasa utilizando p-nitrofenilbutirato (PNPB) como sustrato. El producto de esta reacción es el p-nitrofenol, compuesto que absorbe en el espectro visible dando una coloración amarilla al medio, de forma que puede seguirse su aparición y acumulación de forma continua por lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 348 nm. El equipo utilizado se ha descrito en el apartado 2.2.3.

Para esta medida, se utiliza una cubeta que contiene 2,5 ml de una disolución 0,4 mM de PNPB en una solución tampón fosfato 25 mM a pH 7,0 y a una temperatura de 25°C, que se mantiene constante con una camisa termostatizada. El sistema se mantiene con agitación mediante un agitador magnético (N=500 r.p.m.) y el tiempo cero se considera al añadir 10 mg del derivado enzimático.

El software propio del equipo permite el cálculo de la variación de la medida de absorbancia con el tiempo a medida que avanza la reacción, de forma que se puede calcular la actividad de la enzima, en unidades internacionales (UI), entendida como la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis de PNPB, según las ecuaciones [2.5] y [2.6], que corresponden a la ley de Lambert-Beer y la definición de UI, respectivamente.

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot b \quad [2.5]$$

Siendo $\varepsilon = 5150 \text{ M}^{-1}$ y $b = 1 \text{ cm}$.

$$UI \left(\frac{\mu\text{mol } p\text{-NP}}{\text{min} \cdot \text{mg derivado}} \right) = \left(\frac{dC}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \cdot \frac{V_{\text{reacción}}}{m \text{ derivado}} \quad [2.6]$$

Para medir la estabilidad de los biocatalizadores probados se incuban muestras con la misma actividad volumétrica (UI/mL preparación enzimática)

bajo condiciones específicas de pH (medio tamponado) y temperatura. A diferentes tiempos de incubación, se obtienen muestras de la preparación enzimática y se evalúa la actividad enzimática remanente, de acuerdo a los métodos previamente descritos. La estabilidad enzimática se expresa en términos de actividad relativa, según la ecuación [2.7].

$$a_R = \frac{a_i}{a_0} = \frac{(dA/dt)_i}{(dA/dt)_0} \quad [2.7]$$

2.3.3. Caracterización química de producto

2.3.3.1. *Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Para comprobar la naturaleza del producto obtenido en la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina, se obtuvieron los espectros unidimensionales de protón (^1H) y carbono 13 (^{13}C), así como los espectros DEPT135, para estudiar el tipo de carbono 13 y su posible enlace a otros átomos distintos del hidrógeno, y 2D HMBC-RMN, para comprender la naturaleza de los átomos de hidrógeno que interactúan con los de carbono ubicados en las posiciones 2 ó 3 respecto del considerado. Este análisis bidimensional demuestra que la estructura del compuesto corresponde a la de α -monobenzoato de glicerol, con un grupo carboxílico enlazado a un grupo metílico de la glicerina interactuando con el grupo metílico opuesto dentro de la misma molécula, el cual está a su vez unido a un grupo hidroxilo (Figura 2.8). El espectro DEPT135 incluye un grupo metílico unido a un carbono o heteroátomo (señal positiva a $\delta = 25.62$) (Figura 2.9).

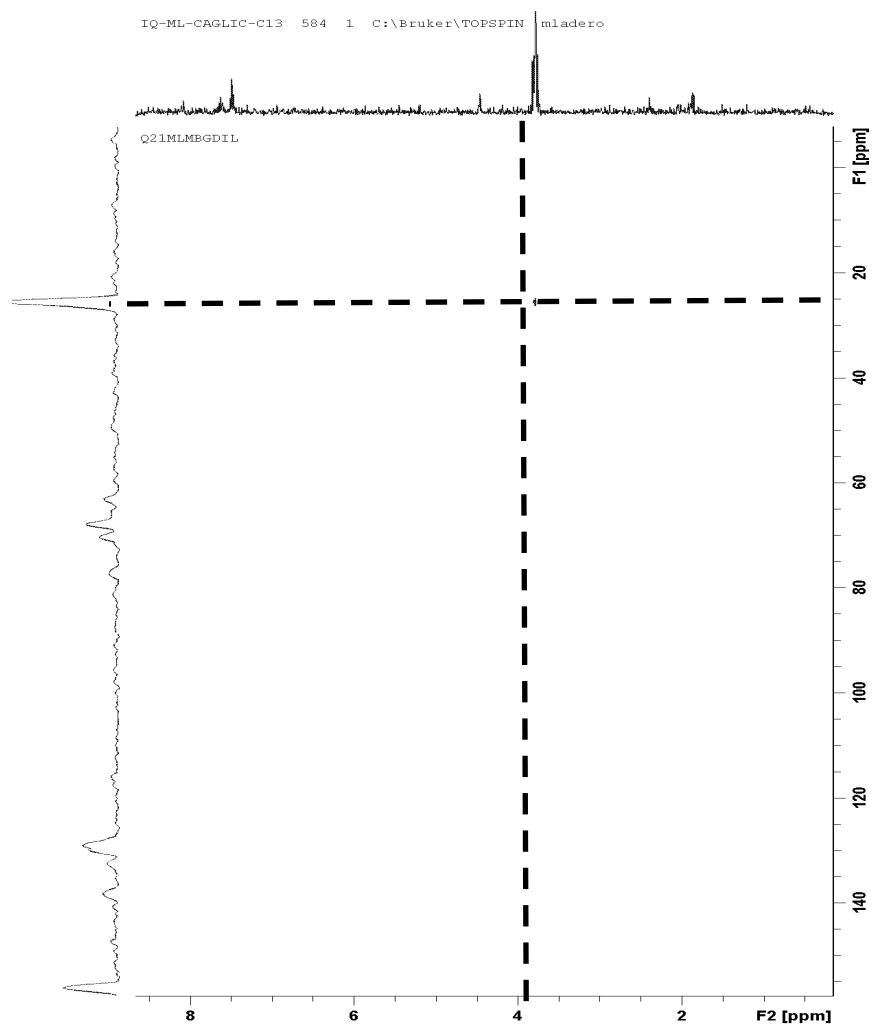


Figura 2.8. Espectro bidimensional ^{13}C - ^1H HMBC-RMN del α -monobenzoato de glicerol al 70% (muestra de reacción a X=70%). Se muestra la interacción del carbono $\text{H}_2\text{C-O-R}$ con los protones del $\text{H}_2\text{C-OH}$ opuesto en la zona glicérica de la molécula del éster.

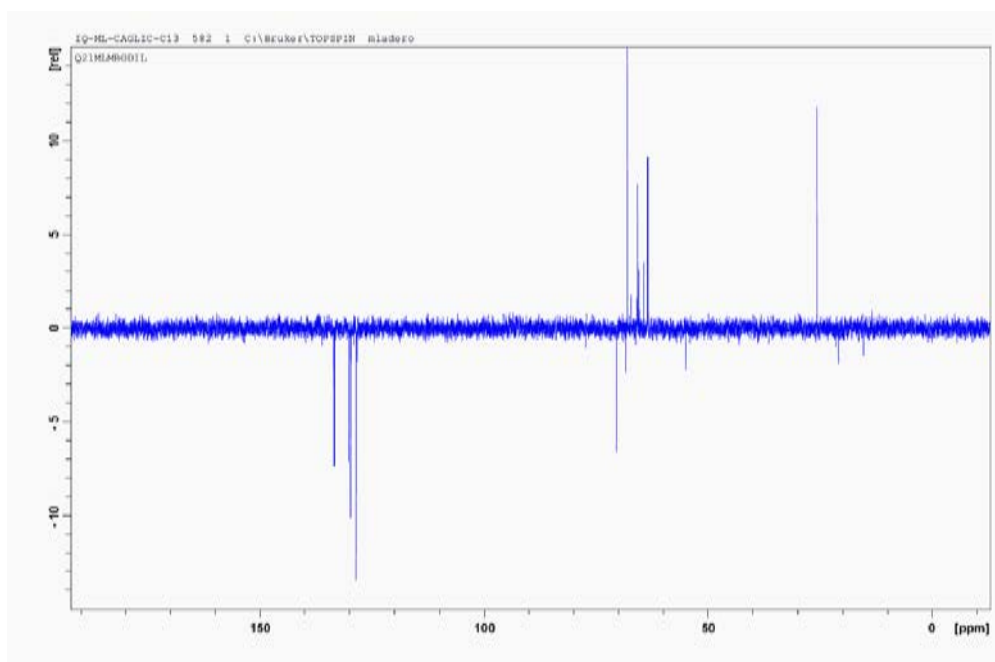


Figura 2.9 Espectro ^{13}C DEPT con desplazamiento 135 del α -monobenzoato de glicerol al 70% (muestra de reacción a X=70%).

2.3.3.2. Espectrometría de masas (MS)

Como se describe en el punto 2.2.3, los espectros de espectrometría de masas se obtienen por ionización de electrospray tras una separación por cromatografía HPLC del compuesto en cuestión y un cambio de disolvente (del eluyente utilizado en HPLC, una mezcla metanol: agua, a metanol). El espectro mostrado en la Figura 2.10 presenta un pico de masa 194,6, mientras que la masa del producto esperado es de 196, lo que se justifica, en gran parte, por la pérdida de un protón en el proceso de ionización electrónica.

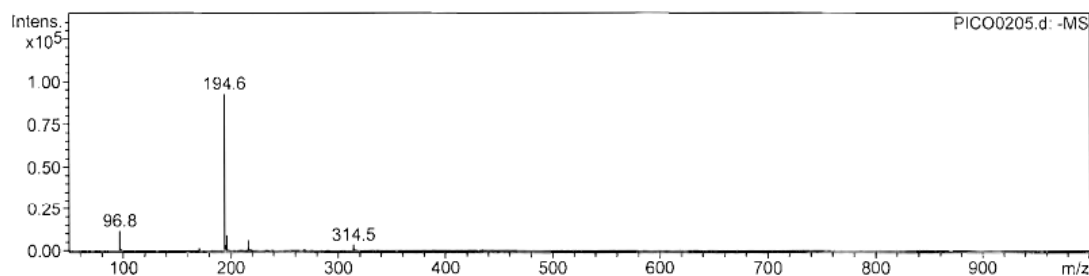
Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name PICO0205.d Acquisition Date 10/10/11 13:39:14
Method XQ Default.ms Operator Dr. Nour Kayali
Sample Name PICO 2 Instrument Esquire-LC_00126
Comment DIRECTO, EN MeOH

Acquisition Parameter

Ion Source Type ESI Ion Polarity Negative Alternating Ion Polarity n/a
Mass Range Mode Std/Normal Scan Begin 50.00 m/z Scan End 1000.00 m/z
Capillary Exit -26.4 Volt Skim 1 -5.8 Volt Trap Drive 30.0
Accumulation Time 41424 μ s Averages 12 Spectra Auto MS/MS Off



#	m/z	I	FWHM	S/N
1	96.8	11706	0.3	2409.5
2	194.6	92614	0.3	19063.3
3	195.6	1885	0.3	388.0
4	196.6	9027	0.3	1858.1
5	216.6	6267	0.4	1290.0
6	314.5	3383	0.4	696.3

Figura 2.10. Espectro de masas (ionización por electrospray) del producto obtenido y purificado por HPLC (α -monobenzoato de glicerol).

2.3.4. Propiedades de filtros solares

2.3.4.1. *Actividad (SPF)*

La medida de la actividad como filtro ultravioleta del monoglicérido de ácido p-metoxicinámico se expresa en términos de Factor de Protección Solar (SPF), que se define como el coeficiente de la relación que existe entre el tiempo mínimo de aparición de un eritema, dosis eritematogena mínima (DEM) en una piel protegida con un filtro solar y la DEM en una piel no protegida.

En el cálculo de este parámetro se tienen en consideración múltiples factores, entre ellos la intensidad de la radiación incidente y la longitud de onda de la radiación. Siguiendo la expresión de Diffey y Robson (Diffey, 1989), el valor del SPF se puede determinar mediante la ecuación [2.8]

$$SPF = \frac{\sum_{(400-290)} E_{\lambda} \cdot B_{\lambda}}{\sum_{(400-290)} \frac{E_{\lambda} \cdot B_{\lambda}}{MPF_{\lambda}}} \quad [2.8]$$

donde E_{λ} corresponde al espectro de irradiación solar sobre la tierra en unas condiciones determinadas (mediodía, media estación a 40°N, 20° del cenit solar); B_{λ} es la eficacia, para cada longitud de onda, de provocar daños en la piel (eficacia eritematógena) y MPF_{λ} para cada longitud de onda seleccionada, corresponde a la relación de señal de referencia (sustrato sin muestra) con la señal de muestra (sustrato con muestra).

Para la obtención de estos datos, se aplica un método “*in vitro*”, utilizando los datos medidos para el espectro de absorción UV de una muestra, medido seis veces en el rango de 200 a 400 nm, a una temperatura constante e igual a 25°C, por medio del siguiente el procedimiento:

- Se aplica una muestra del compuesto problema sobre un film adhesivo poroso que emula a la piel (Transpore 3M, con un tamaño de 25mm x 5 mm), de manera uniforme de forma que se disponga de una capa de 2 mg/cm² de producto.
- El film con muestra se coloca entre el haz de luz y la ventana de entrada de éste en el detector de la celda de medida. En la ventana de la celda de referencia se coloca un trozo del mismo film sin muestra, marcando la línea de base de absorbancia para el espectro, que típicamente tendría el aspecto de la Figura 2.11.

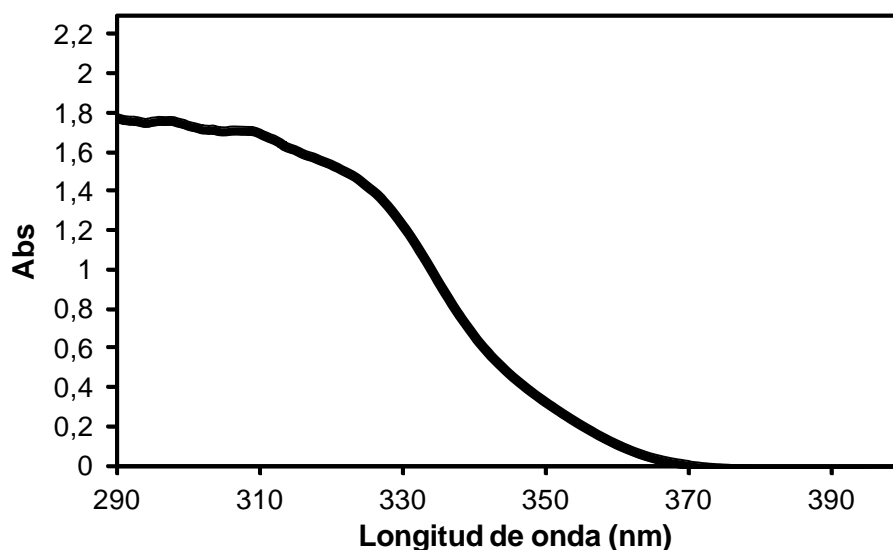


Figura 2.11. Espectro UV de absorción de MG. Ensayo de medida de SPF

2.3.4.2. Fotoestabilidad

Para esta medida, se estudia el comportamiento de los filtros UV, bajo unas condiciones que simulan el uso del producto, es decir, sometiéndolo a radiación solar. Para esto se utiliza el simulador solar, descrito en el apartado 2.2.4 de este trabajo, de la siguiente forma:

Se preparan las muestras que contienen monoglicérido del ácido p-metoxicinámico colocando el film sobre un portaobjetos, para facilitar su manejo y situarlos bajo la radiación de la lámpara HQI-R 250W. Las muestras se irradian durante 19 horas, retirándose a tiempos determinados. Posteriormente, son analizadas en el espectrofotómetro para determinarse su actividad como filtro UV, que se expresa en términos de SPF, tal como se describe en el apartado 2.3.3.1. En la Figura 2.12 se muestra un ejemplo de la evolución de la absorbancia en el ultravioleta, es decir, la fotodegradación que sufre una muestra de monoéster por efecto de la radiación solar simulada a lo largo del tiempo.

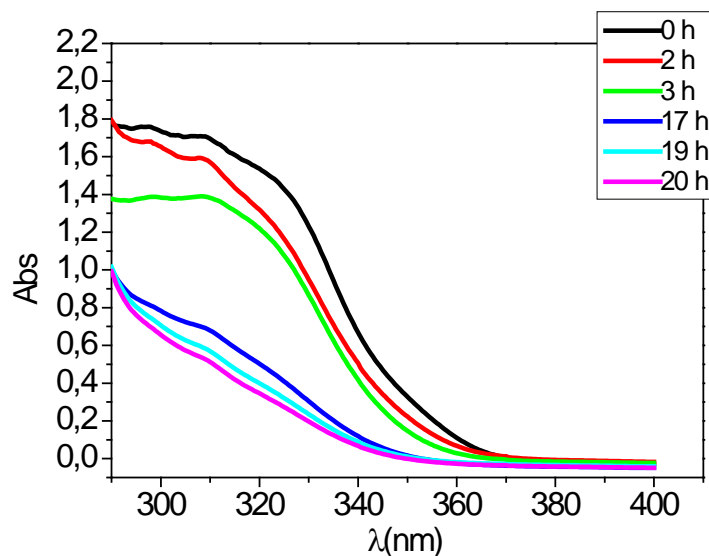


Figura 2.12. Ejemplo de ensayo de fotodegradación de una muestra de reacción de esterificación de metoxicinámico y glicerina ($X_M=0,9$; $C_G/C_M=9/1$)

2.3.4.3. Hidrofobicidad

Otra característica importante a tener en cuenta en un filtro UV para aplicación en cremas solares, es su hidrofobicidad/hidrofilicidad. A efectos comparativos, se determina el coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow} ó P_{ow}) del MG producto de la esterificación de ácido p-metoxicinámico y glicerina, que se define como la relación de las concentraciones de la sustancia problema en una mezcla bifásica formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio: n-octanol y agua.

En este trabajo, se ha aplicado la técnica cromatográfica CLAR (cromatografía líquida de alta resolución o HPLC en fase reversa), válido para valores de $\log P_{ow}$ entre 0 y 6 y que determina el coeficiente de reparto en función del tiempo de retención del compuesto estudiado, al pasar por una columna C-18 (que, como se explica en los apartados 2.2.2 y 2.3.2.1 separa componentes de una mezcla según su polaridad) (Ladero y col., 2011). Este coeficiente es función del factor de capacidad k, propio del equipo, que viene dado por la expresión [2.9].

$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} \quad [2.9]$$

donde $t_{R,i}$ es el tiempo de retención de la sustancia i y t_0 es el tiempo muerto (tiempo medio que necesita el disolvente para recorrer la columna. Se debe obtener, en primer lugar, una recta de calibrado de la forma $\log P_{OW,i}$ frente a k_i de entre 5 y 10 sustancias patrón, con coeficientes de reparto bien conocidos, preferentemente en el intervalo 0 - 6. Los compuestos elegidos se recogen en la Tabla 2.5 y la recta de calibrado obtenida se presenta en la Figura 2.13.

Tabla 2.5. Coeficiente de reparto de compuestos de referencia/calibrado de método CLAR

Compuestos	Log P_{ow} (teórico)	Referencias
1,4-benzoquinona	0,2	(Ladero y col., 2006)
Anilina	0,9	(OECD, 1989)
Dimetilaminopiridina	1,3	
Fenol	1,5	
2 nitrofenol	1,8	
benzoico	1,9	
cinámico	2,1	
Tolueno	2,7	
Naftaleno	3,6	
OMC	6	(Straub, 2002; Teng y col., 2007; Hasan y col., 2009), (Straub, 2002)
Metoxicinámico	1,8	(Human Metabolome project., 2012)

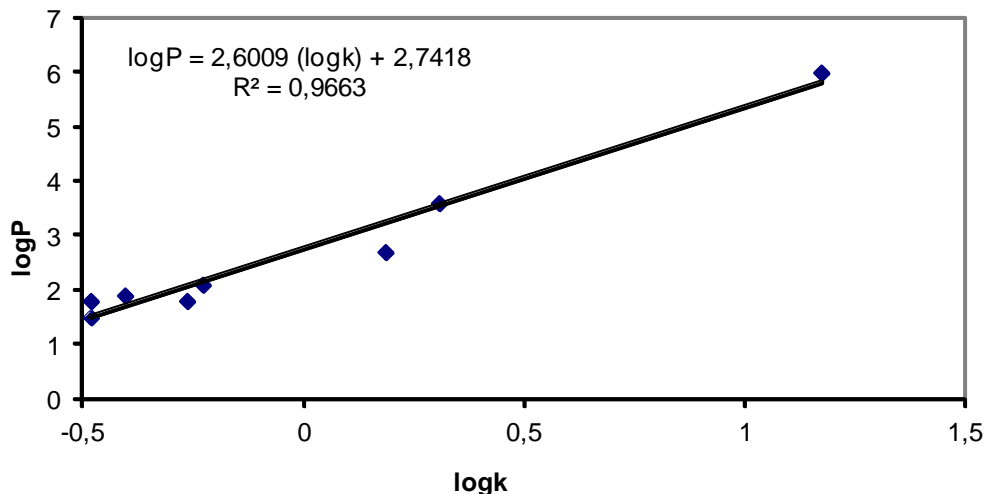


Figura 2.13. Calibrado para la obtención del coeficiente de reparto $\log P_{ow}$

Para la preparación de las muestras, se han utilizado viales de HPLC en los cuales se introduce 1 mg de cada compuesto referencia, 750 μL de metanol, 250 μL de agua ácida (0,5 g/L). De igual forma, se preparan viales con el producto problema (MG)

El eluyente utilizado es una mezcla metanol-agua en una relación 3/1 v/v, fluyendo en isocrático a un caudal de 1 mL/min. La temperatura de la columna es de 308 ± 2 K. Es importante que los compuestos problema y de referencia sean solubles en la fase móvil en concentraciones adecuadas para permitir su detección. El valor del pH es fundamental, debe situarse en el intervalo de pH de funcionamiento de la columna (entre 2 y 8).

2.3.5. Caracterización del soporte de la enzima inmovilizada

2.3.5.1. *Superficie específica BET*

El método BET (Brunauer, Emmett y Teller) se introdujo en 1938 y es el más común para la determinación de la superficie específica. El área BET se calcula partiendo de la teoría de adsorción en multicapa. Este método se basa en el supuesto de que una primera capa de moléculas se adsorben sobre la superficie (interacciones adsorbente-adsorbato) mientras que las capas

subsiguientes de moléculas adsorbidas sólo sufrirán interacciones adsorbato - adsorbato (condensación).

La ecuación BET genera una expresión lineal, como se presenta en la ecuación [2.10].

$$\frac{P_S}{V_A(P_0 - P_S)} = \frac{1}{V_m C} + \left[\frac{C-1}{V_m C} \right] * \frac{P_S}{P_0} \quad [2.10]$$

Se elige un intervalo de presiones relativas (generalmente 0,05 – 0,2) para aplicar la función BET a partir de los datos de la isoterma que proporciona el aparato de medida (V_A vs. P_S). Operando con los resultados del ajuste lineal de la ecuación [2.10], se determina el volumen de la monocapa (V_M), que permite el cálculo de la superficie específica BET, aplicando la expresión [2.11].

$$S_{BET} = \frac{V_m * N_A * A_M}{M_V} \quad [2.11]$$

2.3.5.2. Distribución de tamaño de poro (BJH)

Una isoterma completa de adsorción y desorción de nitrógeno puede también utilizarse para el cálculo de la distribución de tamaños de poro de un material sólido poroso. El método utilizado se basa en la ecuación de Kelvin para, haciendo uso del área de las paredes del poro, correlacionar la presión relativa de nitrógeno en equilibrio con el sólido poroso con el tamaño de poros, suponiendo estos cilíndricos.

Los mesoporos se van llenando progresivamente con adsorbato por un proceso de condensación capilar. Sucesivas capas de moléculas van condensando a medida que aumenta el tamaño del poro, hasta que todos los mesoporos y macroporos estén llenos de adsorbato líquido, momento en el que P_S/P_0 alcanza la unidad. A lo largo de la isoterma de desorción, el volumen

desorbido de la muestra a diferentes valores decrecientes de presiones relativas se transforma en volúmenes equivalentes de líquido.

La ecuación de Kelvin se utiliza para calcular el radio de la molécula líquida en el capilar, como describe la ecuación [2.12]:

$$RT_{N_2} \ln \frac{P_S}{P_0} = 2\gamma \frac{V_M}{R_K} \quad [2.12]$$

Sustituyendo los valores de las diferentes constantes y resolviendo la ecuación [2.12] para R_K , se obtiene la ecuación [2.13].

$$R_K^0 (\text{Å}) = 4,14 * \log \frac{P_S}{P_0} \quad [2.13]$$

El espesor de la película de nitrógeno adsorbido en las paredes del poro a una presión relativa dada, se calcula con la ecuación modificada de Halsey (Ecuación [2.14]).

$$t^0 (\text{Å}) = 3,54 * \left[\frac{5}{2,30 * \log \frac{P_0}{P_S}} \right]^{1/3} \quad [2.14]$$

El valor final de radio de poro, R_P , se determina por adición del espesor de capa, t , al valor de radio Kelvin, R_K .

2.4. MÉTODOS DE AJUSTE MATEMÁTICO

En este apartado se describen los métodos matemáticos aplicados a lo largo del presente trabajo. Todos los programas de cálculo empleados se han desarrollado empleando el software Aspen Custom Modeler.

Para realizar el cálculo de los parámetros de los modelos cinéticos propuestos, se ha utilizado el método integral (integrando las ecuaciones diferenciales), debido a que los datos obtenidos en la experimentación realizada son integrales (cambio de las concentraciones con el tiempo) y al considerable error que se introduce en el cálculo si se emplea el método diferencial con este tipo de datos (García-Ochoa y col., 1992).

La integración de las ecuaciones diferenciales que componen los modelos cinéticos ha sido llevada a cabo numéricamente, siendo el método numérico de integración empleado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden incluido dentro del software Aspen Custom Modeler, según se explica en el diagrama de flujo de la Figura 2.14. El ajuste a los datos experimentales con determinadas ecuaciones, mediante técnicas de regresión, ha sido empleado tanto en la obtención de las ecuaciones de calibrado como en la obtención de los parámetros cinéticos en los modelos propuestos en la presente Memoria.

El criterio de optimización empleado en este caso ha sido el de los mínimos cuadrados, expresado por la ecuación [2.15]. En los casos en que se ha empleado este tipo de regresión, para describir la bondad del ajuste se ha utilizado el coeficiente de regresión, r :

$$\sum_{i=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{teor}})^2 \longrightarrow \text{mínimo} \quad [2.15]$$

El ajuste a los datos experimentales para obtener los parámetros cinéticos de los modelos cinéticos planteados se ha llevado a cabo mediante regresión no lineal; para ello, se ha empleado el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Marquardt 1963). Como todos los modelos cinéticos propuestos incluyen varias

reacciones simples, se ha de utilizar una regresión no lineal múltiple, con varias respuestas o ecuaciones diferenciales, una para cada compuesto clave implicado en cada red de reacciones (así, cada concentración es una variable dependiente), con el tiempo como variable independiente. El algoritmo de regresión, en este caso, minimiza también la suma de los residuos al cuadrado de cada especie (ecuación [2.15]). De esta forma, se hace necesario igualar los residuos de los diferentes componentes en múltiple respuesta, en caso de que los valores de unos componentes respecto a otros presenten diferencias significativas en órdenes de magnitud, para ello se “pesan los residuos”, para que todos los valores presenten la misma significación en el criterio de regresión, empleando un factor de pesada (w_j).

El proceso de discriminación entre modelos cinéticos lleva al modelo que mejor se ajusta a los resultados experimentales a través de varias etapas. En primer lugar, se ha realizado el ajuste de los modelos a los datos experimentales a temperatura constante (es decir, experimento a experimento). Posteriormente, los parámetros obtenidos para cada temperatura se han utilizado para obtener valores iniciales de los factores preexponenciales y de las energías de activación, utilizando la forma linealizada de la ecuación de Arrhenius. El último paso ha consistido en ajustar los modelos cinéticos a todos los datos experimentales a la vez, con la temperatura como variable independiente incluida en las ecuaciones diferenciales a través de ecuaciones tipo Arrhenius para cada constante cinética. En cada etapa de discriminación, se han considerado varios criterios físicos y estadísticos para seleccionar el modelo más representativo, el que se ajuste mejor a los datos experimentales. Estos criterios se enumeran a continuación:

A) Criterios Estadísticos:

- Suma de residuos al Cuadrado: Cuanto menor sea el valor de este parámetro, mejor será el ajuste de los datos experimentales al correspondiente modelo, como se expresa en la siguiente ecuación:

$$SRC_i = \sum_{i=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{teo}})^2 \rightarrow \text{mínimo} \quad [2.16]$$

- Intervalo de error para cada parámetro: se calcula a partir de datos tabulados y obtenidos a través del parámetro t de Student (t_s) y no debe incluir el valor cero.

- F de Fisher al 95% de confianza ($F_{95\%}$): para comprobar la bondad del ajuste de cada modelo. Cuanto mayor sea el valor del mencionado parámetro $F_{95\%}$, mejor será el ajuste y más representativo el modelo. Este parámetro está definido de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F_{95} = \frac{\sum_{n=1}^N y_{\text{teor}}^2 / K}{\sum_{n=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{teor}})^2 / (N - K)} \quad [2.17]$$

- Criterio de información de Akaike corregido (AICc): los criterios de información sirven para seleccionar el modelo estadísticamente más representativo para una muestra o conjunto de datos a los que ajustar los modelos matemáticos propuestos. El criterio de Akaike (AIC) está diseñado para penalizar la sobreparametrización, al igual que el criterio anterior, la F de Fisher al 95% de confianza. La corrección (AICc), según se muestra en la Ecuación [2.19], es adecuada para una relación de número de datos (N) a número de parámetros del modelo (K) inferior a 40 (Ladero y col., 2011).

$$AICc = AIC + \frac{2K \cdot (K + 1)}{N - K - 1} = N \cdot \ln\left(\frac{SQR}{N}\right) + 2 \cdot K + \frac{2K \cdot (K + 1)}{N - K - 1} \quad [2.18]$$

El siguiente paso es comprobar la posible influencia de la temperatura sobre los parámetros estimados, aplicando los siguientes criterios:

B) Criterios Físicos:

- Energías de activación de las constantes cinéticas: han de ser siempre positivas y estar dentro de un intervalo razonable de valores, teniendo en cuenta que se refieren a reacciones químicas y que, por tanto, han de ser mayores de 20 kJ/mol y no superiores a 200-300 kJ/mol.

Cuando se aplica el método de las velocidades de producción, las ecuaciones equivalentes son las siguientes:

$$R_j = \sum v_{ij} \cdot r_i \quad [2.19]$$

$$\frac{dC_j}{dt} \cdot R_j = \sum v_{ij} \cdot r_i = \sum v_{ij} \cdot f(C_k) \quad [2.20]$$

$$C_j = \sum v_{ij} \cdot r_i \cdot \int_0^t f(C_k), \quad i = 1, NR \quad [2.21]$$

todas ellas para $j = 1, NR$, y siendo R_j la velocidad de producción del compuesto j , v_{ij} el coeficiente estequiométrico del compuesto j en la reacción i , r_i la velocidad de la reacción i , C_j la concentración del compuesto j , y t el tiempo.

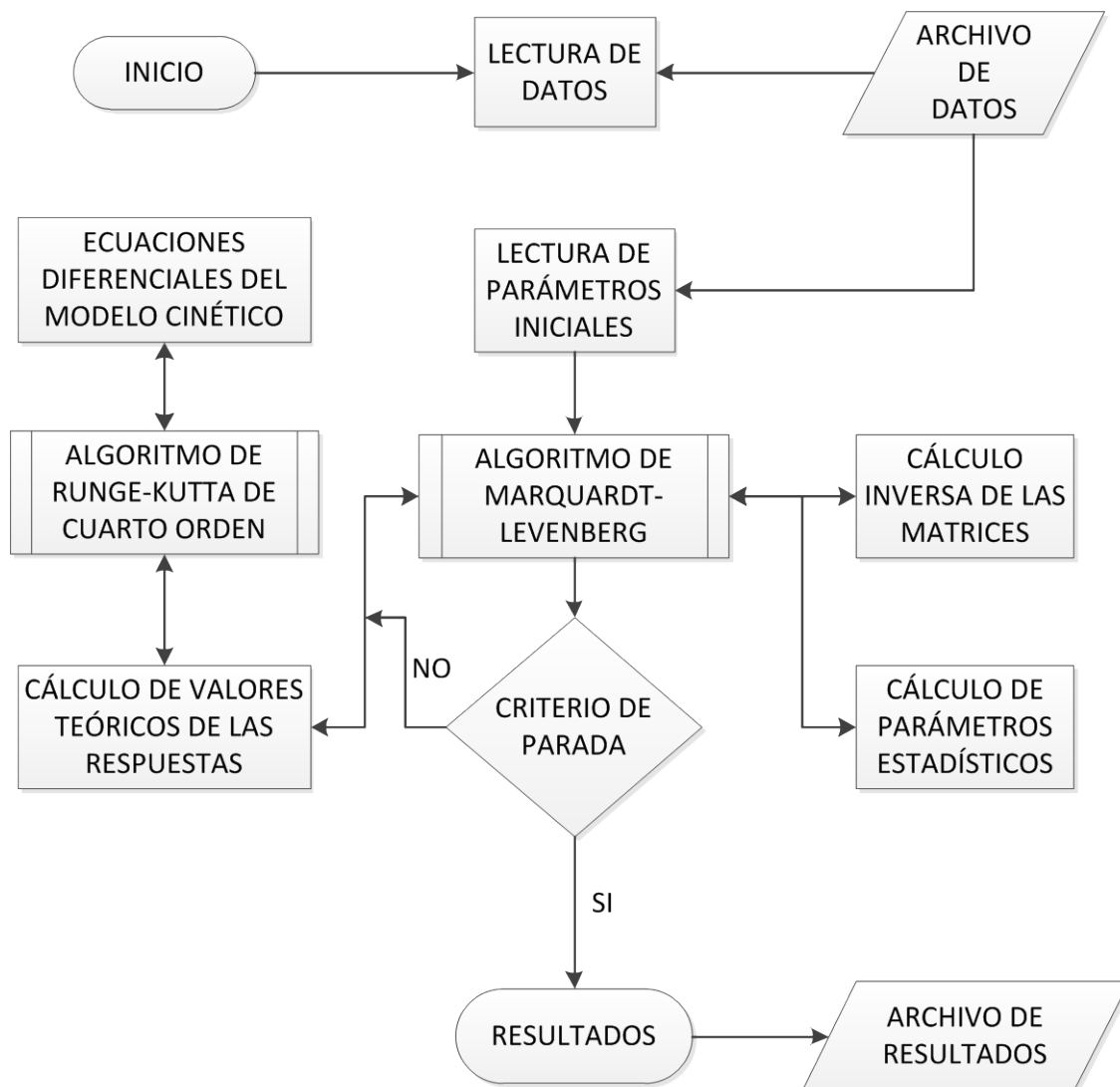


Figura 2.14. Diagrama de flujo del método de ajuste, por regresión no lineal, de los modelos cinéticos propuestos a los datos experimentales

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Diffey, B. L. (1989). "Ultraviolet radiation dosimetry with polysulphone film Radiation Measurement in Photobiology " New York: Academic: 136–159.
- García-Ochoa, F.; A. Romero y V. E. Santos (1992). "Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions." *Int. Chem. Eng.* **32**(2): 538-551.
- Hasan, F.; A. A. Shah y A. Hameed (2009). "Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review." *Biotechnology Advances* **27**(6): 782-798.
- Human Metabolome project. (2012). "Human Metabolome Database." Retrieved 05/04/2012, 2012, from <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB02040>.
- Ladero, M.; M. De Gracia; J. Tamayo; I. Lopez; F. Trujillo y F. Garcia-Ochoa (2011). "Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: Application to industrial operation." *Chemical Engineering Journal* **169**: 319-328.
- Ladero, M.; G. Ruiz; B. C. C. Pessela; A. Vian; A. Santos y F. Garcia-Ochoa (2006). "Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme." *Biochemical Engineering Journal* **31**(1): 14-24.
- Marquardt , D. (1963). "An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters". *SIAM Journal on Applied Mathematics* **11**(2): 431–441.
- OECD (1989). "Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method". **117**.
- Straub, J. O. (2002). "Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data." *Toxicology Letters* **131**(1-2): 29-37.
- Straub, J. O. (2002). "Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data." *Toxicology Letters* **131**(1-2): 29-37.
- Teng, Y. y Y. Xu (2007). "A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent." *Analytical Biochemistry* **363**(2): 297-299.

**3.- Esterificación de Glicerina y
Ácido Benzoico con Lipasa B de
Candida antarctica libre**

3. ESTERIFICACIÓN de GLICERINA y ÁCIDO BENZOICO con LIPASA B de *CANDIDA ANTARCTICA* LIBRE

De forma general, las reacciones de formación de ésteres son catalizadas por bases (preferentemente en reacciones de transesterificación e interesterificación) o por ácidos (lo común en reacciones de esterificación). Estas reacciones también son catalizadas por lipasas, enzimas que son catalizadores especialmente interesantes para este tipo de reacciones debido a su elevada actividad y selectividad en condiciones de operación moderadas. Por esta razón, tienen aplicación en campos muy variados, especialmente si se trata de productos termosensibles o que se pretendan comercializar como “ingredientes naturales”. Se han empleado enzimas de distintos orígenes con resultados muy prometedores. El derivado industrial comercial inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), llamado Novozym® 435 y producido por la empresa Novozymes (Yahya y col., 1998), es el preparado industrial más utilizado hasta la fecha.

La reacción objeto de este estudio es la producción de monobenzoato de glicerol (BG) en posiciones 1 o 3 (o posiciones α). Este monoglicérido tiene aplicaciones como plastificante (Shigeru, 2003), o en la industria farmacéutica para la síntesis de β -bloqueantes o factores activadores de plaquetas (PAFs), (S)-carnitina y ácido γ -amino-13-hidroxi-butírico (GABOB). El método tradicional de síntesis de un monoglicérido es un proceso químico con varias etapas, necesiándose la protección del grupo β -hidroxilo (Yodo y col., 1988; Batovska y col., 2005) como se muestra en las Figuras 3.1 y 3.2.

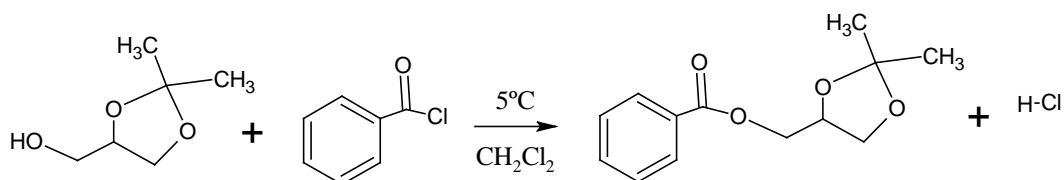


Figura 3.1. Síntesis del acetónido a partir de solketal y cloruro de benzoilo en medio orgánico.

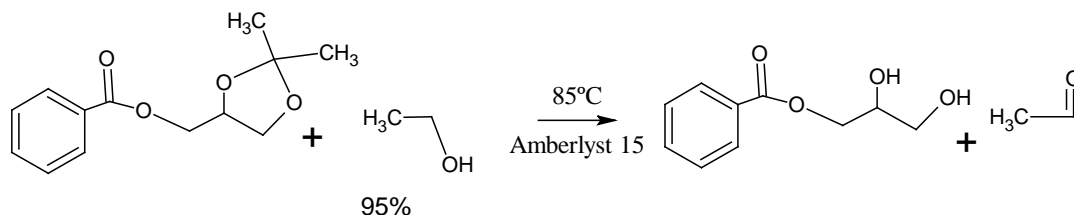


Figura 3.2. Desprotección de los grupos inicialmente bloqueados del acetónido para formar el α -monoglicérido.

Los métodos enzimáticos ofrecen la posibilidad de un proceso en un único paso (ver Figura 3.3) con la opción de controlar la enantioselectividad si es necesario (Kato y col., 1999, 2000; Xu y col., 2001).

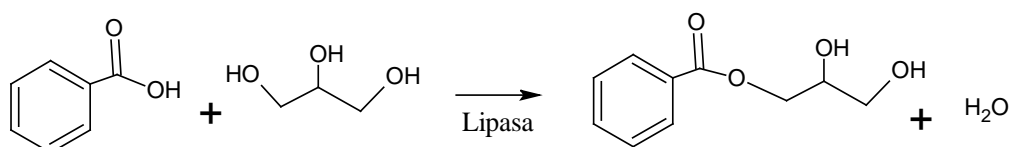


Figura 3.3. Síntesis de un α -monoglicérido por biocatálisis con lipasas

La síntesis del α -monobenzoato de glicerina (BG) es posible, tanto a escala de laboratorio como semi-preparativa, por diversos métodos tales como la esterificación de anhídrido benzoico y glicerina (Xu y col., 2001), la transesterificación de dicho anhídrido con vinilbenzoato (Kato y col., 1999, 2000) en 1,4-dioxano, una transesterificación similar con metilbenzoato en 2-metil-1-propanol (Ceni y col., 2009) o bien esta última reacción usando como disolvente n-butano a media presión (Ceni y col., 2010).

Aunque la catálisis enzimática utilizando disolventes orgánicos comunes ha sido muy estudiada, existen complicaciones en el cambio de escala de alguno de estos procesos, debido a las grandes cantidades de disolvente que es necesario utilizar y que dificultan la viabilidad económica, debido al elevado gasto energético en las etapas de recuperación de disolvente. Se ha planteado como solución la utilización de fluidos supercríticos o de líquidos iónicos o HFCs (Ghanem, 2007), especialmente si el producto va a tener aplicación en la industria alimentaria. En este contexto, los sistemas libres de disolvente surgen como una alternativa interesante tanto desde el punto de vista económico como medioambiental. Muchos de estos sistemas son multifásicos, bien por la limitada solubilidad de los componentes de la mezcla, bien por la presencia de un catalizador sólido. Sin embargo, la presencia de varias fases no tiene que suponer, en principio, la existencia de limitaciones difusionales, es decir, una desventaja desde el punto de vista cinético (Kim y col., 1991; Selmi y col., 1997). Además, se ha comprobado también que la glicerina, como otros compuestos higroscópicos, es un estabilizante enzimático, lo cual le da aún más valor a este compuesto como disolvente para la síntesis de α -monobenzoato de glicerol (Kobayashi y col., 2008).

La hidrólisis enzimática con lipasas se ha estudiado en profundidad. Sin embargo, la cinética de las reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por enzimas ha despertado interés solo en la última década. Se han publicado varios trabajos alrededor de la cinética de estas reacciones catalizadas por lipasas entre glicerol y ácidos aromáticos, sobretudo en medio orgánico. Algunos autores explican la cinética de la síntesis de metil- y butilbenzoatos con lipasa de *Candida rugosa* siguiendo un mecanismo secuencial "ping-pong bi-bi" con inhibición total por parte del alcohol (Leszczak y col., 1998). La corrección de esta suposición se comprobó en la síntesis sin disolvente de diacilgliceroles de ácido ferúlico catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada, Novozym® 435 (Sun y col., 2009). También se observó inhibición en la esterificación de ácido butírico y alcohol isoamílico, suponiendo que la naturaleza de ambos sustratos (ambos de cadena corta) contribuye a la formación de un complejo intermedio enzima-sustrato inactivo (Hari Krishna y col., 2001). También se ha planteado un mecanismo "ping-pong bi-bi" con

inhibición por ambos sustratos en la síntesis de acetato de citronelol en tolueno catalizada por Novozym® 435 (Yadav y col., 2010).

Un aspecto de vital importancia para la aplicación industrial de lipasas como catalizadores es su posible desactivación. En la literatura hay algunos ejemplos de reacciones catalizadas por lipasas donde se ha observado desactivación por efecto del ácido (Hari Krishna y col., 2001) o de la temperatura (Yadav y col., 2008). El mecanismo “ping-pong bi-bi” con inhibición total por sustrato se considera de nuevo como el mecanismo cinético más adecuado para la transesterificación de hidrazina y fenilbenzoato. En cualquier caso, se ha detectado la desactivación de la Novozym® 435 tanto por la hidrazina reactivo como por el fenol producto; estando sus concentraciones reflejadas en los modelos de desactivación de dos reacciones de primer orden en serie (Yadav y col., 2010). Este mismo catalizador se ha utilizado para la epoxidación de estireno. En este caso, la desactivación se explica como el resultado de tres contribuciones en paralelo debido al peróxido de hidrógeno, al ácido perláurico y a la temperatura, todos ellos procesos con cinética de primer orden (Yadav y col., 2006). Se han hecho las mismas observaciones para la peroxidasa de rábano, donde la desactivación es el resultado de la combinación de dos factores, el peróxido de hidrógeno y el dodecilsulfato de sodio o SDS (Nazari y col., 2005).

En este capítulo se realiza un estudio previo para seleccionar la lipasa industrial de mayor actividad para la esterificación que conduce al producto de interés, delimitando las condiciones de trabajo en lo que respecta a la temperatura de reacción (entre 50 y 70 °C) y a la concentración de ácido benzoico en el glicerol, que actúa a la vez de reactivo y disolvente (concentraciones entre 20 y 60 g/L). A continuación, se llevaron a cabo varios experimentos para observar si existía inhibición por sustrato y productos y determinar la estabilidad térmica y química de la enzima seleccionada. Posteriormente se ha realizado un estudio cinético dentro de estos límites, obteniendo datos que permitieran discriminar entre varios modelos cinéticos propuestos, algunos de los cuales incluyen la desactivación de la enzima durante la esterificación de glicerol y ácido benzoico. De esta forma, se ha seleccionado el modelo cinético que mejor se ajusta a los datos experimentales.

3.1. EXPERIMENTOS PREVIOS

Como primer paso para el estudio cinético del sistema, se han desarrollado una serie de experimentos con el objetivo de conocer las condiciones más apropiadas de operación. Estas etapas son las siguientes:

- Selección del catalizador.
- Determinación del intervalo de concentración y de temperatura.
- Estudio de las limitaciones al transporte de materia.
- Consideración de la posible inhibición de la enzima.
- Estudio de la desactivación de la enzima.

3.1.1. Comparación de diferentes enzimas

Se han probado lipasas de diferentes orígenes para seleccionar las enzimas más apropiadas considerando su actividad para obtener el producto deseado. Se ha probado la lipasa de *Candida rugosa* liofilizada (AY30), la de *Thermomyces lanuginosus* y la lipasa B de *Candida antarctica*, esta última como una solución estabilizada en glicerina comercializada por Novozymes y que responde al nombre de Lypozyme CALB-L.

En primer lugar, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.2.2, se ha evaluado la actividad hidrolítica de cada enzima en unidades internacionales (UI) en la hidrólisis del sustrato sintético p-nitrofenilbutirato (PNPB), obteniéndose los resultados que se recogen en la Figura 3.4. Como se puede observar, en todos los casos tiene lugar la reacción química, liberándose p-nitrofenol al medio, de manera que se puede afirmar que todas las lipasas son activas para la reacción de hidrólisis de PNPB. Sin embargo, cuando se comprueba su actividad en la síntesis de α -monoglicérido del ácido benzoico, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1, se comprueba un comportamiento muy distinto. En todos los casos, la actividad sintética resulta inferior, pudiéndose afirmar, como se explica en la Tabla 3.1, que sólo CALBL

presenta una actividad considerable. La velocidad de aparición del monoglicérido es demasiado pequeña en los otros dos casos, de manera que se descartan estas enzimas como posibles biocatalizadores para el proceso que se describe en esta Memoria. Esta diferencia entre actividad en hidrólisis y en esterificación se podría deber a la diferente capacidad de las enzimas para interaccionar con agua y con polialcoholes como la glicerina. A partir de este punto, el trabajo se centra en la actividad sintética que presenta la enzima libre B de *Candida antarctica*.

Además, e independientemente de la lipasa utilizada, solamente se producen monoglicéridos de ácido benzoico y glicerina, sin aparecer picos a tiempos elevados en el cromatograma que puedan pertenecer a diésteres o triésteres de glicerol y ácido benzoico.

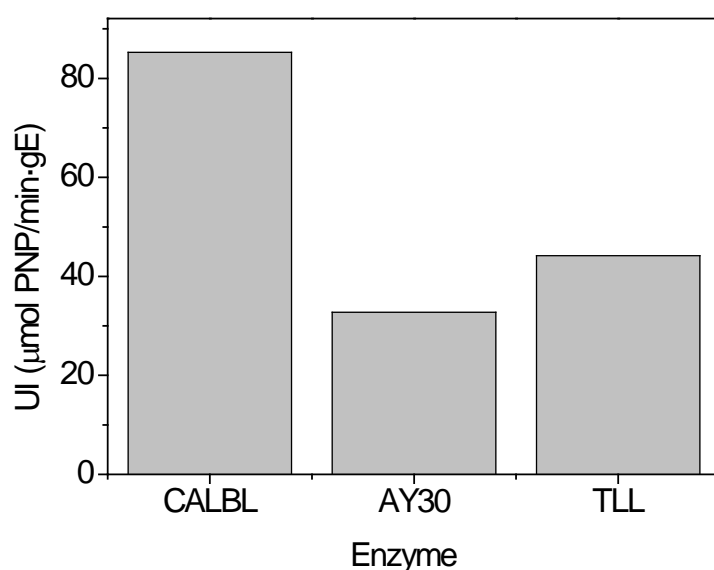


Figura 3.4. Actividad hidrolítica de varias lipasas en estado libre.

Tabla 3.1. Actividades hidrolítica (de p-NPB) y sintética (Esterificación de ácido benzoico y glicerina con enzimas comerciales).

Enzima	Actividad hidrolítica específica (mmol pNP/min·g _E)	Actividad sintética específica (μmol BG/ min·g _E)
CALBL	85,27	0,11
C. rugosa AY30	32,76	4,46·10 ⁻⁵
TLL	44,16	2,23·10 ⁻⁵

3.1.2. Intervalo de condiciones de operación

Se ha acotado el campo experimental atendiendo a dos aspectos: la solubilidad del ácido benzoico en glicerina pura y la temperatura. Se ha seguido el procedimiento explicado en el punto 2.3.1.

Como se puede observar en la Figura 3.5, la cantidad de ácido benzoico que puede disolverse en glicerina pura es limitada. La temperatura es un factor que favorece la disolución, de manera que cuanto mayor es la temperatura, mayor es la cantidad disponible de sustrato para la esterificación en un medio homogéneo. En este caso, la solubilidad aumentó de forma exponencial con la temperatura. Según esta observación, la temperatura de operación ha de ser lo más alta posible para optimizar el proceso. Sin embargo, una temperatura muy elevada desactiva al biocatalizador, siendo este punto determinante para fijar el intervalo de trabajo. En consecuencia con lo anterior, se propuso un límite inferior de 50°C y un límite superior de 70°C, y concentraciones de 20 a 60 g/L de ácido que garantizan la homogeneidad de la mezcla.

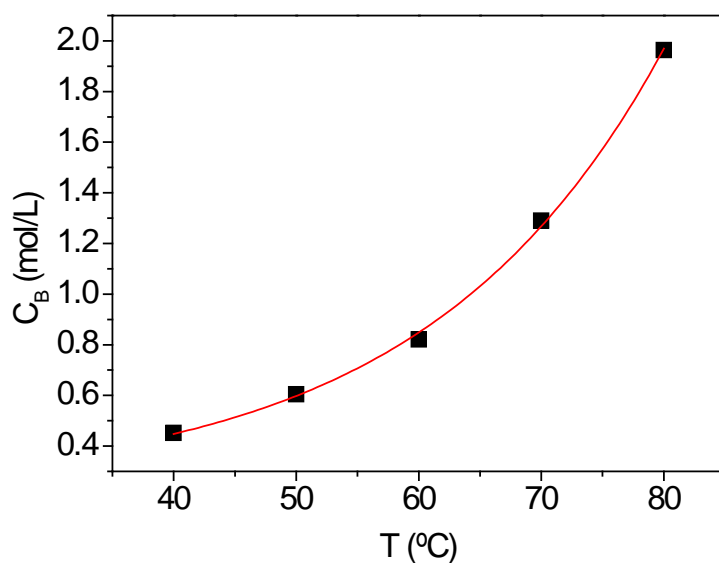


Figura 3.5. Curva de solubilidad de ácido benzoico en glicerina pura

Una vez se conocieron las condiciones en las que el ácido benzoico es soluble en glicerina, se estudiaron las posibles limitaciones al transporte de materia. Utilizando la instalación descrita en el punto 2.2.1, se varió la velocidad de agitación entre 0 y 500 r.p.m. para comprobar la existencia o no de resistencia al transporte externo. Como se puede observar en la Figura 3.6, las posibles limitaciones al transporte externo no son significativas a partir de 120 r.p.m. Se eligió, por tanto, una velocidad de agitación moderada de 250 r.p.m. para minimizar la mezcla con el oxígeno atmosférico y reducir así la oxidación del ácido y de sus ésteres. Con esta serie de experimentos, además, se puede comprobar la reproducibilidad de los resultados.

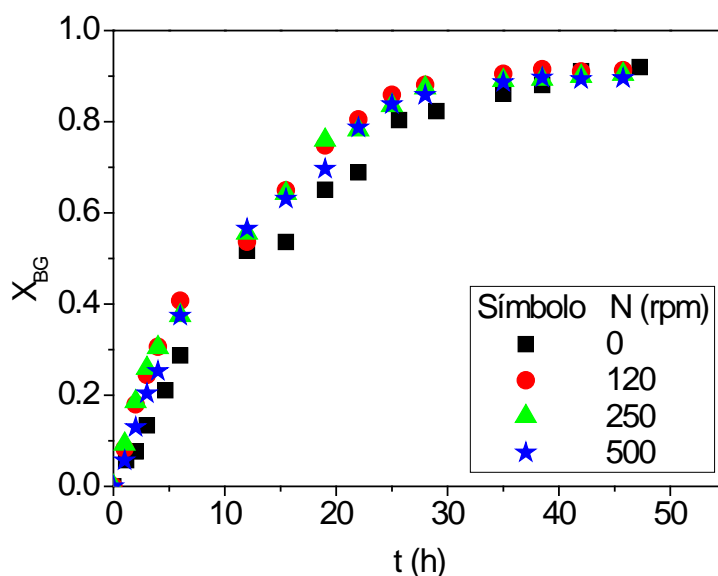


Figura 3.6. Efecto de la velocidad de agitación sobre la evolución de la conversión de monoglicérido. $C_{B,0}=30$ g/L; $T=60^{\circ}\text{C}$; $C_E=3000$ mg/L

3.1.3. Estudios de inhibición y desactivación

Dado el complejo mecanismo catalítico de una enzima, es bien conocido el efecto activador o inhibidor que puede ejercer sobre su actividad la presencia de reactivos o productos en el medio de reacción. Por esta razón, se han realizado una serie de experimentos para comprobar los siguientes efectos:

- Inhibición/activación por productos (BG y agua)
- Inhibición/activación por reactivos (ácido benzoico)

No se prueba el efecto inhibidor/activador del segundo reactivo de esterificación, el glicerol, ya que, siendo a su vez el medio de reacción, se encontrará siempre en un gran exceso respecto a las demás especies.

Inhibición por productos

La inhibición por productos se ha estudiado llevando a cabo la reacción catalizada por la enzima en presencia de una concentración determinada de alguno de los productos de reacción desde tiempo cero. Los experimentos se han realizado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1,

añadiendo cada uno de los productos por separado en concentraciones entre 0 y 50 g/L, temperatura de 60°C y 3000 mg/L de CALBL.

En la Figura 3.7 se muestra el efecto de añadir a tiempo cero de reacción concentraciones crecientes del éster, mientras que la Figura 3.8 refleja los resultados obtenidos en experimentos en los que se añadía agua al comienzo de cada uno de ellos. En ambas figuras se observa que la esterificación de ácido benzoico con glicerina catalizada por CALBL avanza de la misma manera en todos los experimentos, independientemente de las concentraciones iniciales de productos. En todos los casos se alcanzan valores de conversión de alrededor de 0,9 y no se observa desplazamiento del equilibrio hacia los reactivos, incluso utilizando concentraciones iniciales muy elevadas de productos. Este nulo efecto sobre la posición de equilibrio es muy probable que se deba al gran exceso de glicerina, cuya concentración es 20 veces superior a la de ácido benzoico, como mínimo.

Por tanto, se puede deducir que la lipasa no sufre inhibición por ninguno de los productos de reacción a las concentraciones en las que éstos se encuentran en el medio de reacción. Además, no parecen existir fenómenos de desactivación inducidos por la presencia de monoéster o de agua.

Es de destacar especialmente el hecho de que, a diferencia de lo que ocurre en las reacciones tradicionales de esterificación en medio orgánico catalizadas por lipasas, incluida la lipasa B de *Candida antarctica* (Yahya y col., 1998), el agua no tiene un efecto perjudicial para la velocidad de producción del monoéster, incluso trabajando con valores de concentración de hasta un orden de magnitud superiores a las esperadas a conversión completa del ácido. En la literatura se encuentran referencias donde se han probado con cierto éxito varias técnicas para eliminar el agua, como la utilización de tamices moleculares o sales higroscópicas como Na_2SO_4 (Yahya y col., 1998; Kato y col., 2000); también se plantea la utilización de membranas de pervaporación (Korkmaz y col., 2009) como sistema efectivo para la obtención de mayores rendimientos en reacciones de esterificación y transesterificación.

Sin embargo, en ausencia de disolventes orgánicos, el glicerol, que es el componente mayoritario del medio de reacción en este trabajo, favorece la

migración del agua de las inmediaciones del centro activo de la enzima, donde tiene lugar la reacción química, hacia el seno del fluido, debido a la notoria hidrofiliidad e higroscopia del polialcohol. Así, al disminuir la concentración local de agua cerca del centro activo, se puede estar evitando la reacción inversa de hidrólisis del monoéster, manteniendo la hidratación necesaria para su actividad catalítica. En disolventes orgánicos hidrofóbicos es fácil deducir que el agua se va a acumular cerca del centro activo, en torno a aminoácidos polares. Esta acumulación de agua cerca de la zona de reacción, en cambio, favorecería la reacción inversa de hidrólisis y reduciría la productividad al éster, modificando la posición de equilibrio en contra de la producción del mismo.

Por otro lado, si se atiende a la velocidad inicial de reacción, se observa que ésta es menor cuanto mayor es la concentración de agua. Este fenómeno tiene lugar por causa de la solubilidad del ácido, ya que cuanto más hidrofílico es el medio, menor es dicha solubilidad. La cantidad real de ácido en disolución, que es la susceptible de reaccionar, es menor y, por lo tanto, también la velocidad de esterificación. Cuando la reacción ha transcurrido disminuyendo la concentración de ácido por debajo del límite de solubilidad hasta volver a condiciones homogéneas, la velocidad se ve incrementada por los efectos favorables del agua tanto sobre el equilibrio, como se ha comentado antes, como sobre el transporte de materia, en el caso de utilizar enzimas inmovilizadas. Además, hay que considerar que el límite de solubilidad se podría modificar según varíe la composición del medio al transcurrir la reacción, ya que este se enriquece en agua y en el monoglicérido. La primera reduce la solubilidad del ácido, mientras que el segundo la mejora.

A la vista de estos resultados, para este sistema, en las condiciones experimentales elegidas, no es necesaria la implementación de ninguna técnica para eliminar agua del medio de reacción o controlar su actividad, lo que facilita significativamente el diseño de la instalación y el propio desarrollo de los experimentos. Además, con estos resultados, se ha comprobado que los datos obtenidos son muy repetitivos.

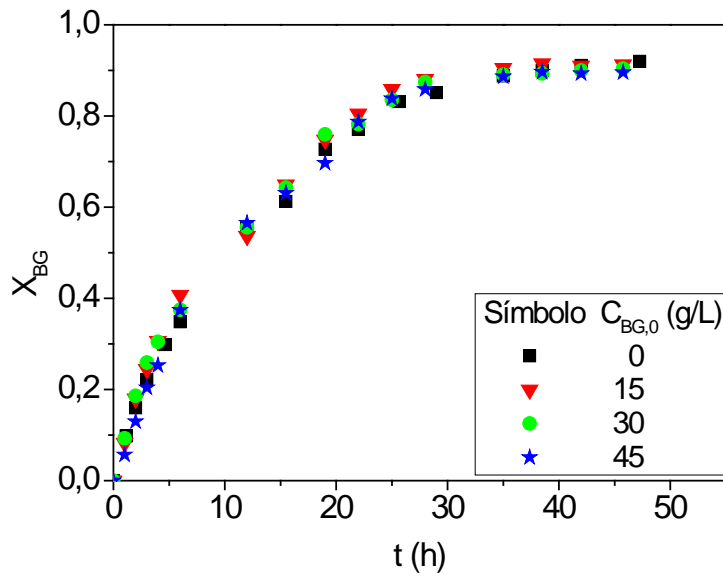


Figura 3.7. Conversión de BG en función del tiempo de reacción a distintas concentraciones iniciales de éster. Condiciones: $T=60^{\circ}C$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=3000$ mg/L

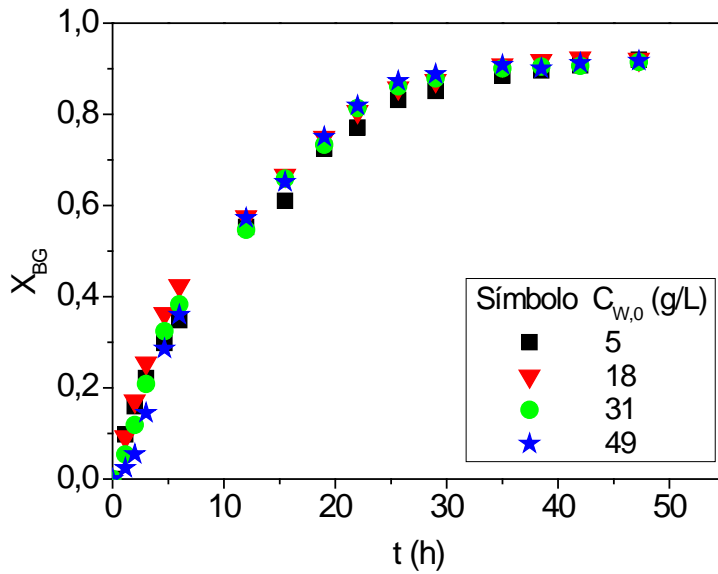


Figura 3.8. Conversión de BG en función del tiempo de reacción a distintas concentraciones iniciales de agua. Condiciones: $T=60^{\circ}C$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=3000$ mg/L

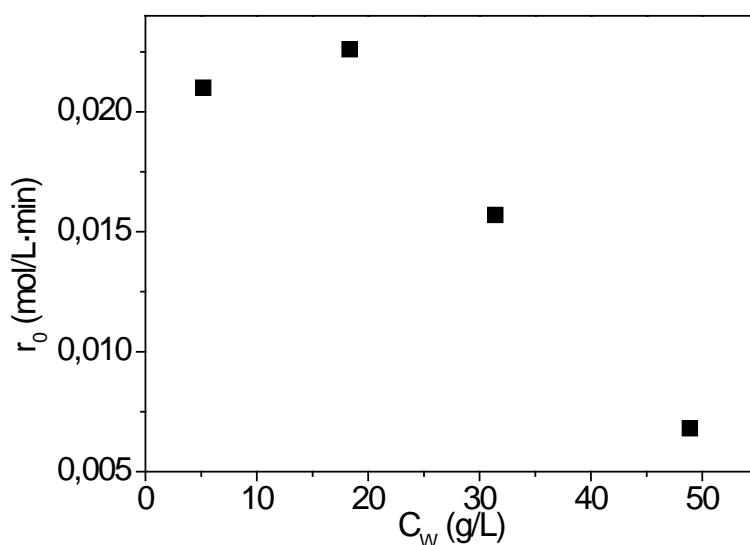


Figura 3.9. Velocidad inicial de reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina frente a concentración inicial de agua en el medio de reacción.

Condiciones: $T=60^{\circ}\text{C}$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=3000$ mg/L.

Inhibición por reactivos y desactivación de la enzima

Asimismo, se ha estudiado el efecto de distintas concentraciones de ácido benzoico en la velocidad de reacción, en un intervalo de concentraciones entre 20 y 60 g/L, trabajando a una temperatura de 60 °C y con una concentración de biocatalizador de 3000 mg/L de CALBL.

La Figura 3.10 muestra los resultados de conversión de ácido benzoico a diferentes tiempos de reacción para experimentos a 50 y 70 °C, con 20 y 60 g/L de concentración inicial de ácido benzoico. Se aprecia la mayor velocidad inicial en los experimentos a mayor temperatura, así como una mayor diferencia entre concentraciones según la temperatura es mayor, indicando un efecto de inhibición o desactivación que es más acusado cuanto mayor es la temperatura. En la Figura 3.11 se puede observar que, a una misma temperatura, una mayor concentración de reactivo favorece la velocidad inicial de reacción y que este efecto se ve potenciado a temperaturas mayores; ambos efectos son coherentes con la cinética de una reacción química. Sin embargo, por encima de 55 °C, se observa que la velocidad inicial de reacción específica pasa por un máximo de concentración de ácido a partir del cual empieza a disminuir, tanto más

acusadamente cuanto mayor es el valor de temperatura. Este comportamiento, observado para todas las temperaturas, se puede explicar con una inhibición por sustrato como se ha propuesto en otros trabajos (Hari Krishna y col., 2001; Yadav y col., 2008, 2010). Si esto fuese válido para el sistema objeto de este estudio, el valor del máximo debería ubicarse a una misma concentración independientemente del valor de temperatura. La forma parabólica esperada para la inhibición por sustrato sólo es válida para temperaturas superiores a 55°C; además, los máximos de actividad tampoco responden a un valor determinado de concentración de ácido benzoico, sino que se desplazan a valores inferiores de concentración para mayores valores de temperatura. Todos estos son indicios que hacen pensar que la enzima no está siendo inhibida por el ácido reactivo de la esterificación, sino que, más bien, éste funciona como un agente desactivante.

La temperatura parece ser un factor determinante para la estabilidad de la CALBL y el hecho de que la diferencia en conversiones y en velocidades resulte más pronunciada a mayores concentraciones de ácido benzoico significa que existe una sinergia positiva o un efecto acumulativo que afecta la desactivación enzimática, lo que implica a la temperatura de reacción y a la concentración de ácido. De esta forma, el efecto desactivante del ácido benzoico es tanto mayor cuanto mayor es la temperatura.

A la vista de estos resultados, independientemente que el fenómeno de la desactivación sea considerado en el estudio cinético de este sistema, la temperatura tiene un límite superior para que sea viable su utilización como catalizador de la esterificación de ácido benzoico y glicerina, determinado por la estabilidad de la CALB. A primera vista, este límite no sobrepasaría los 60 °C para las concentraciones de ácido benzoico estudiadas, aunque este extremo se comprueba en posteriores experimentos.

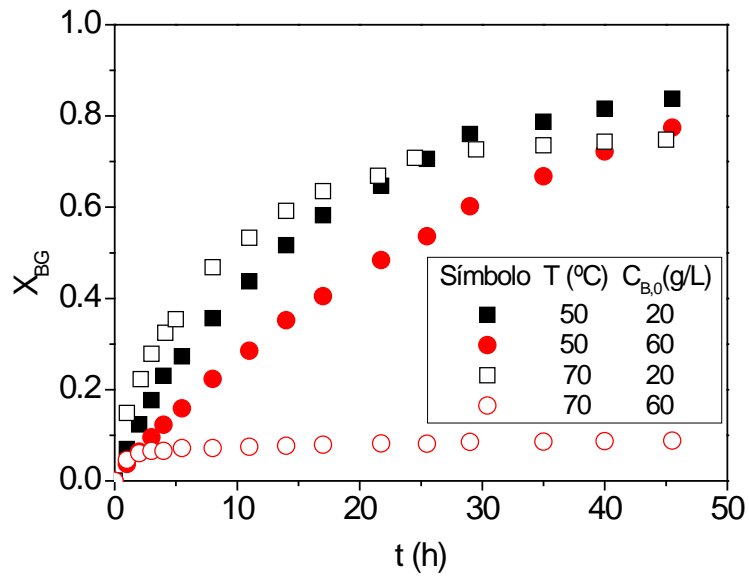


Figura 3.10. Conversión de BG frente al tiempo para las reacciones extremas de temperatura y concentración estudiadas ($C_E=3000$ mg/L).

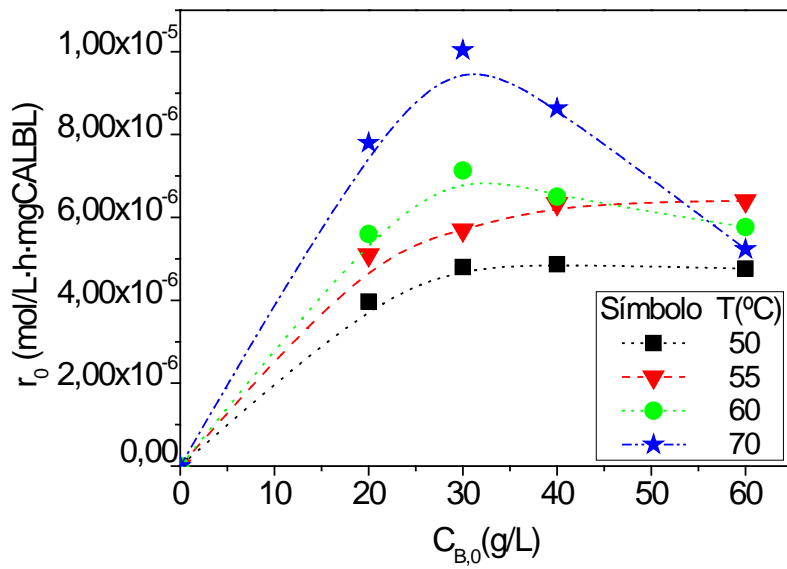


Figura 3.11. Efecto de la concentración de ácido benzoico y de la temperatura sobre la actividad de CALBL (Método de velocidades iniciales)

3.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS CINÉTICOS

Teniendo en cuenta el intervalo de condiciones de operación condicionado por los resultados de los experimentos previos, es decir, que existe una concentración máxima de ácido benzoico limitada por la solubilidad del ácido y una temperatura máxima debido a por la estabilidad de la lipasa, se ha fijado un intervalo de condiciones de trabajo y, dentro de este intervalo, una programación experimental para determinar la cinética del proceso que se muestra en la Tabla 3.2.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en las Tablas 3.3. a 3.6. En cada una de ellas se muestran los resultados de cuatro experimentos realizados con distinta concentración inicial de ácido, de tal forma que cada tabla muestra los resultados conseguidos a una misma temperatura.

Tabla 3.2. Condiciones de operación de experimentos esterificación de ácido benzoico con glicerina catalizada por CALBL (N=250 rpm; C_E=3000 mg/L)

Experimento	T (°C)	C _{B,0} (g/L)
L1	50	20
L2	50	30
L3	50	40
L4	50	60
L5	55	20
L6	55	30
L7	55	40
L8	55	60
L9	60	20
L10	60	30
L11	60	40
L12	60	60
L13	70	20
L14	70	30
L15	70	40
L16	70	60

Tabla 3.3. Resultados de los experimentos L1 a L4 (T=50°C)

L1	20 g/L		L2	30 g/L	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,013	0,07	1,0	0,017	0,06
2,0	0,023	0,12	2,0	0,027	0,10
3,0	0,033	0,18	3,0	0,038	0,14
4,0	0,043	0,23	4,5	0,053	0,19
5,5	0,051	0,27	6,0	0,070	0,26
8,0	0,067	0,36	8,0	0,082	0,30
11,0	0,082	0,44	11,0	0,103	0,38
14,0	0,097	0,52	14,0	0,123	0,45
17,0	0,109	0,58	17,0	0,138	0,51
21,8	0,121	0,65	23,0	0,165	0,61
25,5	0,132	0,71	26,5	0,177	0,65
29,0	0,142	0,76	30,0	0,191	0,70
35,0	0,151	0,81	35,0	0,193	0,71
40,0	0,161	0,86	40,0	0,220	0,81
45,5	0,163	0,87	47,0	0,227	0,84

Tabla 3.4. Resultados de los experimentos L1 a L4 (T=50°C) (continuación)

L3	40 g/L		L4	60 g/L	
t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}	t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,017	0,05	1,0	0,017	0,04
2,0	0,030	0,08	2,0	0,030	0,06
3,0	0,042	0,12	3,0	0,045	0,10
4,0	0,057	0,16	4,0	0,057	0,12
5,5	0,068	0,19	5,5	0,074	0,16
8,0	0,095	0,26	8,0	0,104	0,22
11,0	0,125	0,35	11,0	0,133	0,29
14,0	0,147	0,41	14,0	0,164	0,35
17,0	0,170	0,47	17,0	0,189	0,40
21,8	0,194	0,54	21,8	0,226	0,48
25,5	0,211	0,59	25,5	0,250	0,54
29,0	0,236	0,65	29,0	0,281	0,60
35,0	0,253	0,70	35,0	0,302	0,65
40,0	0,277	0,77	40,0	0,324	0,69
45,5	0,287	0,79	45,5	0,347	0,74

Tabla 3.5. Resultados de los experimentos L5 a L8 (T=55°C)

L5	20 g/L		L6	30 g/L	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,018	0,10	1,0	0,019	0,07
2,0	0,032	0,17	2,0	0,034	0,12
3,0	0,039	0,22	3,0	0,048	0,18
4,5	0,050	0,27	4,5	0,065	0,24
6,0	0,059	0,33	6,0	0,081	0,30
8,0	0,072	0,40	8,0	0,090	0,33
11,0	0,086	0,47	11,0	0,118	0,44
14,0	0,099	0,55	14,0	0,138	0,51
17,0	0,109	0,60	17,0	0,148	0,55
22,0	0,123	0,68	23,0	0,176	0,65
26,0	0,137	0,75	26,5	0,194	0,72
30,0	0,138	0,76	30,0	0,195	0,72
35,0	0,146	0,81	35,0	0,207	0,77
40,0	0,149	0,82	40,0	0,213	0,79
45,0	0,155	0,86	47,0	0,221	0,82

Tabla 3.6. Resultados de los experimentos L5 a L8 (T=55°C) (continuación)

L7	40 g/L		L8	60 g/L	
t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}	t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,021	0,06	1,0	0,022	0,04
2,0	0,037	0,10	2,0	0,039	0,08
3,0	0,047	0,13	3,0	0,052	0,10
4,5	0,064	0,18	4,5	0,068	0,13
6,0	0,075	0,21	6,0	0,082	0,16
8,0	0,098	0,28	8,0	0,097	0,19
11,0	0,119	0,34	11,0	0,118	0,23
14,0	0,141	0,40	14,0	0,137	0,26
17,0	0,160	0,45	17,0	0,153	0,29
22,0	0,171	0,49	22,0	0,158	0,30
26,0	0,196	0,56	26,0	0,182	0,35
30,0	0,207	0,59	30,0	0,196	0,38
35,0	0,229	0,65	35,0	0,200	0,38
40,0	0,241	0,68	40,0	0,206	0,40
45,0	0,249	0,71	45,0	0,215	0,41

Tabla 3.7. Resultados de los experimentos L9 a L12 (T=60°C)

L9	20 g/L		L10	30 g/L	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,017	0,10	1,0	0,024	0,09
2,1	0,032	0,19	2,0	0,041	0,15
3,0	0,038	0,23	3,0	0,055	0,21
4,1	0,049	0,30	4,5	0,071	0,27
5,0	0,055	0,33	6,0	0,089	0,33
8,0	0,078	0,47	8,0	0,102	0,38
11,0	0,092	0,55	11,0	0,124	0,46
14,0	0,105	0,63	14,0	0,146	0,55
17,0	0,114	0,69	17,0	0,159	0,60
21,5	0,120	0,72	23,0	0,182	0,68
24,5	0,127	0,76	26,5	0,190	0,71
29,5	0,136	0,81	30,0	0,197	0,74
35,0	0,137	0,82	35,0	0,207	0,77
40,0	0,139	0,83	40,0	0,210	0,79
45,0	0,140	0,84	47,0	0,210	0,79
51,0	0,142	0,85			

Tabla 3.8. Resultados de los experimentos L9 a L12 (T=60°C) (continuación)

L11	40 g/L		L12	60 g/L	
t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}	t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,024	0,07	1,0	0,023	0,05
2,1	0,039	0,12	2,0	0,038	0,08
3,0	0,051	0,15	3,0	0,054	0,11
4,1	0,064	0,19	4,0	0,061	0,12
5,0	0,073	0,22	5,5	0,071	0,14
8,0	0,098	0,30	8,0	0,082	0,16
11,0	0,119	0,36	11,0	0,089	0,18
14,0	0,141	0,43	14,0	0,095	0,19
17,0	0,160	0,48	17,0	0,100	0,20
21,5	0,177	0,54	21,8	0,105	0,21
24,5	0,193	0,58	25,5	0,112	0,23
29,5	0,213	0,64	29,0	0,119	0,24
35,0	0,219	0,66	35,0	0,123	0,25
40,0	0,231	0,70	40,0	0,128	0,26
45,0	0,230	0,69	45,5	0,133	0,27
51,0	0,236	0,72			

Tabla 3.9. Resultados de los experimentos L13 a L16 (T=70°C)

L13	20 g/L		L14	30 g/L	
t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}	t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,026	0,15	1,0	0,037	0,13
2,1	0,038	0,22	2,0	0,060	0,22
3,0	0,048	0,28	3,0	0,070	0,26
4,1	0,056	0,32	4,5	0,081	0,29
5,0	0,061	0,35	6,0	0,089	0,32
8,0	0,086	0,50	8,0	0,100	0,36
11,0	0,098	0,57	11,0	0,109	0,40
14,0	0,107	0,62	14,0	0,116	0,42
17,0	0,111	0,65	17,0	0,123	0,45
21,5	0,117	0,68	23,0	0,126	0,46
24,5	0,122	0,71	26,5	0,130	0,47
29,5	0,125	0,73	30,0	0,131	0,48
35,0	0,127	0,74	35,0	0,135	0,49
40,0	0,128	0,74	40,0	0,138	0,50
45,0	0,129	0,75	47,0	0,140	0,51
51,0	0,129	0,75			

Tabla 3.10. Resultados de los experimentos L13 a L16 (T=70°C) (continuación)

L15	40 g/L		L16	60 g/L	
t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}	t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}
0,0	0,000	0,00	0,0	0,000	0,00
1,0	0,036	0,11	1,0	0,022	0,05
2,0	0,051	0,15	2,0	0,029	0,06
3,3	0,063	0,18	3,0	0,032	0,07
4,8	0,067	0,20	4,0	0,032	0,07
6,5	0,072	0,21	5,5	0,035	0,07
8,0	0,079	0,23	8,0	0,035	0,07
11,0	0,084	0,25	11,0	0,036	0,07
14,0	0,088	0,26	14,0	0,037	0,08
17,0	0,090	0,26	17,0	0,038	0,08
21,0	0,094	0,28	21,8	0,039	0,08
25,5	0,099	0,29	25,5	0,039	0,08
30,0	0,102	0,30	29,0	0,041	0,09
35,0	0,101	0,30	35,0	0,042	0,09
40,0	0,105	0,31	40,0	0,042	0,09
46,0	0,106	0,31	45,5	0,043	0,09

3.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.3.1. Determinación del modelo cinético

En este apartado se describe la determinación de un modelo cinético capaz de explicar los resultados experimentales reflejados en el apartado anterior. Para ello, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, comparándolos y discriminando entre ellos según criterios físicos y estadísticos, tal como se explicó en el apartado 2.4.

Se han probado varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la síntesis del monoglicérido a partir de ácido benzoico y glicerina en ausencia de otros disolventes orgánicos.

De forma general, se acepta como válido el mecanismo “ping-pong bi-bi” para reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas (Leszczak y col., 1998; Hari Krishna y col., 2001; Yadav y col., 2008; Sun y col., 2009). Este mecanismo implica cuatro pasos secuenciales, como se esquematiza en la Figura 3.6, que se pueden clasificar en dos etapas:

Acilación: Formación de un intermedio tetraédrico por interacción del ácido y posterior liberación de una molécula de agua.

Desacilación: Incorporación de la molécula de alcohol para generar un segundo intermedio tetraédrico y posterior liberación del monoéster con el consecuente restablecimiento de la enzima a su estado original.

De forma general, el modelo al que da lugar el mecanismo “ping-pong bi-bi”, sin inhibición por productos o sustratos, queda reflejado en la siguiente ecuación:

$$r = \frac{k_2 * C_E * C_{alcohol} * C_{ácido}}{K_{M,ácido} * C_{ácido} + K_{M,alcohol} * C_{alcohol} + C_{ácido} * C_{alcohol}} \quad [3.1]$$

En el caso que nos ocupa, el alcohol se encuentra en un exceso muy grande y su concentración puede considerarse prácticamente constante, de forma que la ecuación 3.1 se puede simplificar a la ecuación 3.2. Esta ecuación se aproxima mucho a una expresión de tipo Michaelis-Menten y ha sido la

ecuación base para la propuesta de los distintos modelos cinéticos considerados.

$$r = \frac{k_{app} * C_E * C_{ácido}}{K_{M,ácido} * C_{ácido} + K_1' + C_{ácido} * C_{alcohol}}$$

$$r = \frac{k_{app} * C_E * C_{ácido}}{\left(K_{M,ácido} + C_{alcohol} \right) * C_{ácido} + K_1'}$$

$$r = \frac{k_{app} * C_E * C_{ácido}}{K_2' * C_{ácido} + K_1'}$$

$$r = \frac{\frac{k_{app}}{K_2'} * C_E * C_{ácido}}{C_{ácido} + \frac{K_1'}{K_2'}} = \frac{k * C_E * C_{ácido}}{C_{ácido} + K} \quad [3.2]$$

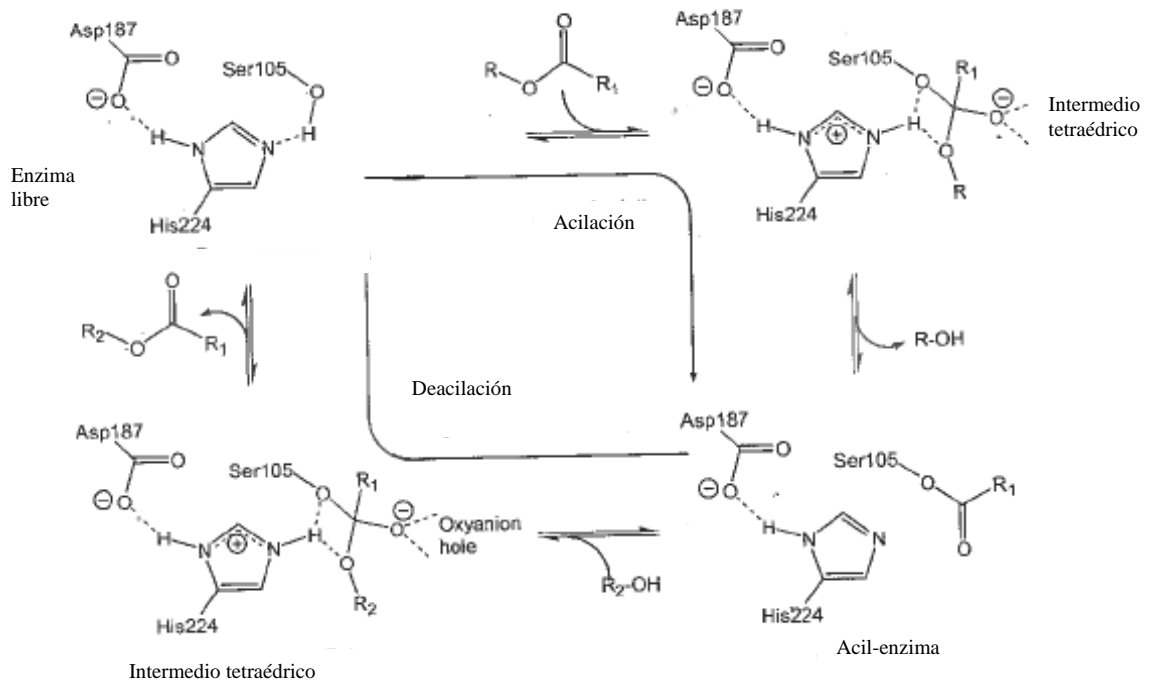


Figura 3.12. Mecanismo de una reacción de esterificación o transesterificación catalizada por CALBL (Ottosson y col., 2001)

A partir del modelo simple de Michaelis-Menten, se proponen una serie de modelos descritos de forma esquemática en la Tabla 3.7, estando sus ecuaciones recogidas en la Tabla 3.8. La desactivación enzimática queda reflejada en los modelos 2 a 4 y es debida, como ya se ha comentado, a la acción sinérgica de temperatura y de ácido benzoico. Dicho fenómeno conduce a una ecuación (ver Ecuación 3.6, en la Tabla 3.8) que contiene un término puramente térmico, de primer orden, y otro de desactivación química, de orden mayor que uno respecto del ácido benzoico. Con esta premisa se consideraron tres posibilidades: desactivación total, desactivación parcial y desactivación de dos reacciones en serie.

Tabla 3.11. Esquemas de modelos propuestos para la esterificación de ácido benzoico y glicerina en medio sin disolvente.

Modelo	Descripción	Esquema de ecuaciones
1	Michaelis-Menten sin desactivación	$B + G \rightarrow MG + W$
2	Michaelis-Menten con desactivación total	$B + G \rightarrow MG + W$ $E \rightarrow E_D$
3	Michaelis-Menten con desactivación parcial	$B + G \rightarrow MG + W$ $E \rightarrow E'$
4	Michaelis-Menten con desactivación parcial en dos reacciones en serie	$B + G \rightarrow MG + W$ $E \rightarrow E' \rightarrow E''$

A continuación se describe de forma pormenorizada cada uno de los modelos propuestos.

Modelo 1:

La ecuación simplificada que se deduce del mecanismo “ping-pong bi-bi” tiene la forma de la expresión de Michaelis-Menten (Ecuación 3.2). Este modelo se propuso como primera aproximación, en condiciones en las que, probablemente, no existe desactivación, es decir, para temperaturas bajas, entre 50 y 60 °C, y para las menores concentraciones iniciales de ácido benzoico: de 20 a 40 g/L.

Modelo 2:

El modelo tipo Michaelis-Menten anterior explica la formación del éster y agua a partir de ácido benzoico y glicerol; el modelo 2 incluye una segunda función que explica la desactivación que sufre la lipasa por efecto de la acción de la temperatura. Esta función se compone de dos términos: uno puramente térmico de orden uno y otro de orden mayor que uno respecto a la concentración de ácido benzoico que busca expresar matemáticamente la sinergia observada experimentalmente entre la temperatura y la concentración de ácido.

La desactivación de la enzima se considera total, es decir, que la forma enzimática generada como consecuencia de la reacción de desactivación (E_D) no presenta actividad catalítica ninguna. En estas circunstancias, la actividad biocatalítica de la lipasa observada en el sistema sería determinada sólo por la concentración remanente de la forma enzimática original (E), según el esquema que se recoge en la Tabla 3.7 y las ecuaciones 3.5 y 3.6 presentadas en la Tabla 3.8.

Modelo 3:

Este modelo es análogo al anterior, con la diferencia de que se considera que la forma enzimática producida por la reacción de desactivación mantiene una cierta actividad residual (β), que se define según la ecuación 3.3.

$$\beta = \frac{a_{E^*}}{a_E} \quad [3.3]$$

La actividad a un tiempo determinado, por lo tanto, vendrá dada por la concentración no desactivada de la forma enzimática original sumada a la actividad relativa de la forma parcialmente desactivada, como se explica en la ecuación 3.8, recogida en la Tabla 3.8.

Modelo 4:

Siguiendo la línea de razonamiento de los modelos anteriores, éste propone representar la evolución de las especies reaccionantes utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, considerando la desactivación como un proceso de dos reacciones en serie que implica la formación de una forma enzimática parcialmente activa, que es, a su vez, un intermedio para una segunda reacción que la desactiva hacia otra forma con una actividad parcial distinta. Se considera también la definición de actividad residual (Ecuación 3.3), para cada una de las formas enzimáticas presentes en el sistema.

Algunos de los parámetros que se utilizan en la determinación del modelo cinético pueden ser función de la temperatura. Si es éste el caso, se asume que las constantes evolucionan según la ecuación 3.4, ecuación que deriva de la de Arrhenius. Esta ecuación tiene la ventaja de llevar siempre a un valor positivo de la constante al ajustarse a datos experimentales y, por otra parte, es más conveniente en regresiones no lineales por la menor diferencia de magnitud entre los dos términos del exponente.

$$k = \exp \left[\ln k_0 - \frac{E_{a,k}}{R \cdot T} \right] \quad [3.4]$$

Como se explica en el apartado 2.4, se ha aplicado el método integral, ajustando, en primer lugar, cada modelo experimento a experimento evaluando el sentido físico y estadístico de cada modelo cinético y de las constantes cinéticas del mismo. Después, se ha realizado un ajuste no lineal múltiple de todos los datos experimentales para obtener los resultados que se resumen en la Tabla 3.8. Para su discriminación, se han empleado criterios físicos tradicionales junto con criterios estadísticos representativos: error estándar, parámetro F de Fischer (F_{95}), suma de residuos al cuadrado (SQR) y criterio de Akaike corregido (AICc) (Ver Tabla 3.9).

El ajuste de los Modelos 2 a 4 a los datos experimentales ha resultado muy razonable. De hecho, el primer modelo, que no incluye desactivación, es el que peor se ajusta, con mucho, a los datos experimentales, lo que se traduce en el mayor valor de SQR, el menor valor del parámetro de Fisher (aunque supera con holgura el mínimo necesario para este parámetro considerando el número de datos y el número de constantes del modelo) y el mayor valor para el criterio de Akaike (el menos negativo). Así, desde el punto de vista estadístico, la desactivación es un fenómeno significativo, lo que también era evidente si se consideraba la evolución temporal de los compuestos implicados, en especial a 70 °C y a las mayores concentraciones iniciales de ácido benzoico.

De acuerdo a los criterios estadísticos mencionados, el modelo cinético que se ajusta con bondad suficiente a los datos experimentales es el de Michaelis-Menten con desactivación parcial de la enzima (Modelo 3), que da valores muy precisos de los parámetros si se atiende a su intervalo de confianza y también si se consideran los parámetros estadísticos sobre la validez del modelo. La suma de residuos al cuadrado con este modelo es baja, pero no la menor. Sin embargo, el número de parámetros que tiene es suficiente para que se ajuste bien a los datos y los parámetros asociados a la bondad del modelo (F_{95} de Fisher, AICc de Akaike) presentan los mejores valores. El Modelo 3 se ha ajustado a los datos experimentales de forma similar al Modelo 4, más complejo, pero incluyendo menos parámetros.

Las Figuras 3.13 a 3.16 muestran el error del ajuste para todos los modelos, para todos los experimentos realizados y en toda la extensión de la reacción de esterificación. Se puede observar que, progresivamente, al introducir más parámetros que expliquen la dependencia de la cinética de la esterificación de glicerina y ácido benzoico con la temperatura y la concentración de los reactivos, las discrepancias de los valores teóricos o predichos por el modelo cinético van siendo cada vez menores. En todos los casos se puede comprobar un error por defecto en la predicción de las concentraciones de monoglicérido a tiempos iniciales y por exceso a tiempos largos de reacción (Figura 3.14). El modelo de Michaelis-Menten no resulta suficiente para reproducir la cinética de este sistema. Al introducir el fenómeno de desactivación total del catalizador, el ajuste, en general, es mejor, aunque hay deficiencias en la predicción de la

concentración del producto a tiempos largos, esta vez por defecto (Figura 3.15), lo cual induce a pensar en la posibilidad de que esté teniendo lugar una desactivación parcial del catalizador.

En las Figuras 3.16 y 3.17, se puede comprobar que el modelo con desactivación parcial de la lipasa, tanto con una como con dos reacciones de desactivación en serie, representan bien los datos experimentales en toda la extensión de la reacción y en todas las condiciones de concentración y temperatura. Incluso a tiempos cortos, donde los valores en términos absolutos son más pequeños y pesan menos en el ajuste matemático. Ocurre lo mismo en el caso de las condiciones límite de concentración inicial (60 g/L de ácido benzoico) y de temperatura (70°C). Como ya se ha comentado, el Modelo 3, que tiene en cuenta la desactivación enzimática parcial con una reacción de desactivación, se acepta como una solución de compromiso entre la bondad del ajuste y la complejidad matemática del modelo.

En cuanto a la desactivación de la enzima, a diferencia de otros trabajos de la literatura (Yao y col., 2002; Ladero y col., 2006; Yadav y col., 2010), no es una reacción de primer orden que culmina con una especie enzimática totalmente desactivada, pero concuerda con la intensa desactivación causada por elevadas concentraciones de ácido benzoico y, a su vez, el efecto estabilizante del glicerol. Para todos los modelos probados, la constante del denominador, K , resulta constante con la temperatura, probablemente debido a que el intervalo de temperatura estudiado no es lo suficientemente amplio como para observar su efecto, demostrándose que, en estas condiciones, la afinidad de la enzima por el sustrato permanece constante. Esta afinidad, visto el valor de la constante de Michaelis-Menten, es baja. Además, los valores de energía de activación, E_a , son similares a los encontrados en la literatura para reacciones enzimáticas similares (Yadav y col., 2008).

Tabla 3.12. Modelos cinéticos propuestos para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina.

Modelo	Ecuaciones Cinéticas	Parámetros dependientes de T (*)
1	$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_{E0} \cdot C_B}{K + C_B}$	[3.2] k
2	$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$ $\frac{dC_E}{dt} = -k_{d1} \cdot C_E - k_{d2} \cdot C_E \cdot C_B^b$	[3.5] [3.6] k, k _{d1} , k _{d2}
3	$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$ $a_R = \frac{C_E + C_E \cdot \beta}{C_{E0}}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_E^*}{dt} = -k_{d1} \cdot C_E - k_{d2} \cdot C_E \cdot C_B^b$	[3.7] [3.8] [3.9] k, k _{d1} , k _{d2} , β
4	$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$ $a_R = \frac{C_E + C_E' \cdot \beta_1 + C_E'' \cdot \beta_2}{C_{E0}}$ $-\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_E'}{dt} + \frac{dC_E''}{dt}$ $\frac{dC_E'}{dt} = -k_{d1}' \cdot C_E' - k_{d2}' \cdot C_E' \cdot C_B^a$ $\frac{dC_E''}{dt} = -k_{d1}'' \cdot C_E'' - k_{d2}'' \cdot C_E'' \cdot C_B^b$	[3.10] [3.11] [3.12] [3.13] [3.14] k, k _{d1} ', k _{d2} ', k _{d1} '', k _{d2} '', β ₁ , β ₂

Tabla 3.9. Modelos cinéticos propuestos para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina.

Modelo	Parámetro	Valor \pm error	SQR	F ₉₅	AICc
1	E _{a,k} (J/mol)	2,59·10 ⁴ \pm 3,42·10 ³	7,52·10 ⁻²	3,50·10 ³	-8.26
	ln _{k0}	-1,94 \pm 1,26			
	K (M)	4,46·10 ⁻¹ \pm 9,93·10 ⁻³			
2	E _{a,k} (J/mol)	3,31·10 ⁴ \pm 1,81·10 ³	1,38·10 ⁻²	1,09·10 ⁴	-9.54
	ln _{k0}	8,83·10 ⁻¹ \pm 6,65·10 ⁻¹			
	K (M)	4,27·10 ⁻¹ \pm 1,10·10 ⁻²			
	b	3,27 \pm 1,14·10 ⁻¹			
	E _{a,kd1} (J/mol)	7,67·10 ⁴ \pm 4,59·10 ³			
	ln _{kd1,0}	2,44·10 ¹ \pm 1,66			
	E _{a,kd2} (J/mol)	1,46·10 ⁵ \pm 3,84·10 ³			
	ln _{kd2,0}	5,36·10 ¹ \pm 1,45			
3	E _{a,k} (J/mol)	4,55·10 ⁴ \pm 1,76·10 ³	8,32·10 ⁻³	1,40·10 ⁴	-9.78
	ln _{k0}	5,46 \pm 6,46·10 ⁻¹			
	K (M)	4,27·10 ⁻¹ \pm 2,53·10 ⁻³			
	b	3,09 \pm 9,12·10 ⁻²			
	E _{a,kd1} (J/mol)	7,61·10 ⁴ \pm 3,82·10 ³			
	ln _{kd1,0}	2,43·10 ¹ \pm 1,37			
	E _{a,kd2} (J/mol)	1,34·10 ⁵ \pm 3,29·10 ³			
	ln _{kd2,0}	4,92·10 ¹ \pm 1,22			
	E _{a,β} (J/mol)	-2,06·10 ⁵ \pm 1,21·10 ⁴			
	ln _{β,0}	-7,75·10 ¹ \pm 4,51			

Tabla 3.9. Modelos cinéticos propuestos para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina. (continuación)

Modelo	Parámetro	Valor \pm error	SQR	F ₉₅	AICc
4	E _{a,k} (J/mol)	4,09·10 ⁴ \pm 3,69·10 ³	7,77·10 ⁻³	8,25·10 ³	-8.49
	ln _{k0}	3,92 \pm 1,35			
	K (M)	4,26·10 ⁻¹ \pm 2,34·10 ⁻³			
	a	2,82 \pm 3,16·10 ⁻¹			
	b	3,12 \pm 2,36·10 ⁻¹			
	E _{a,kd1'} (J/mol)	3,50·10 ⁴ \pm 1,35·10 ⁴			
	ln _{kd1',0}	1,04·10 ¹ \pm 4,91			
	E _{a,kd2'} (J/mol)	1,19·10 ⁵ \pm 1,39·10 ⁴			
	ln _{kd2',0}	4,42·10 ¹ \pm 5,22			
	E _{a,kd1''} (J/mol)	1,72·10 ⁶ \pm 1,08·10 ²			
	ln _{kd1'',0}	6,01·10 ² \pm 3,79·10 ⁻²			
	E _{a,kd2''} (J/mol)	1,20·10 ⁵ \pm 1,30·10 ⁴			
	ln _{kd2'',0}	4,37·10 ¹ \pm 4,73			
	E _{aβ} (J/mol)	-1,53·10 ⁴ \pm 1,00·10 ⁴			
	ln _{β,0}	-6,70 \pm 3,68			
	E _{aβ2} (J/mol)	-5,00·10 ⁵ \pm 5,21·10 ⁴			
ln _{β2,0}	-1,86·10 ² \pm 1,92·10 ¹				

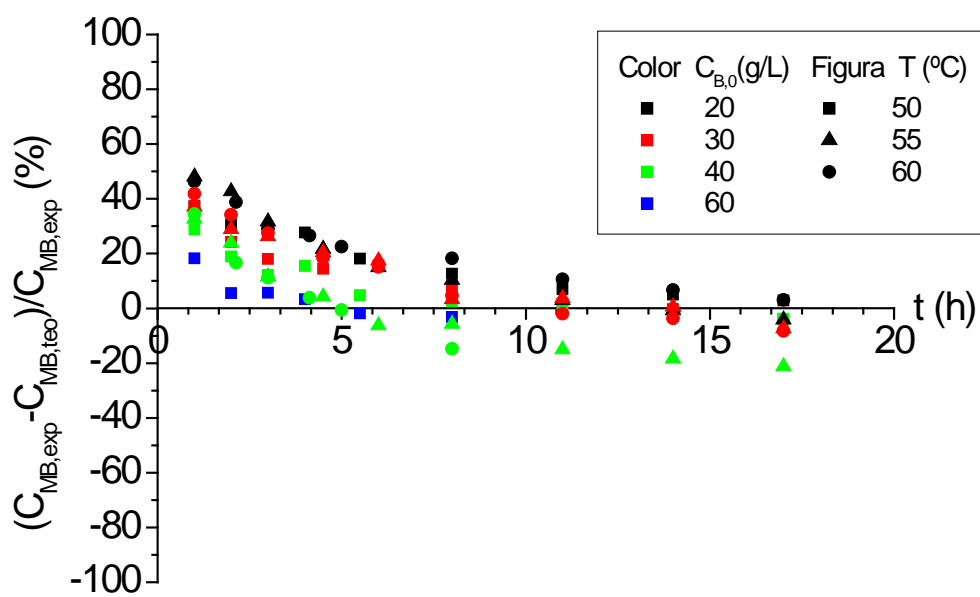


Figura 3.13. Análisis de residuos del Modelo 1

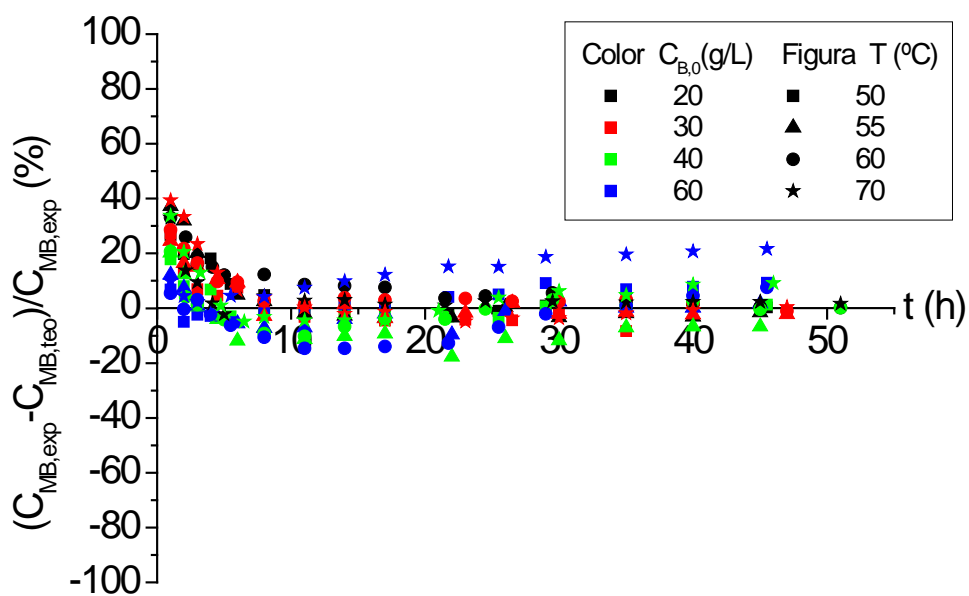


Figura 3.14. Análisis de residuos del Modelo 2

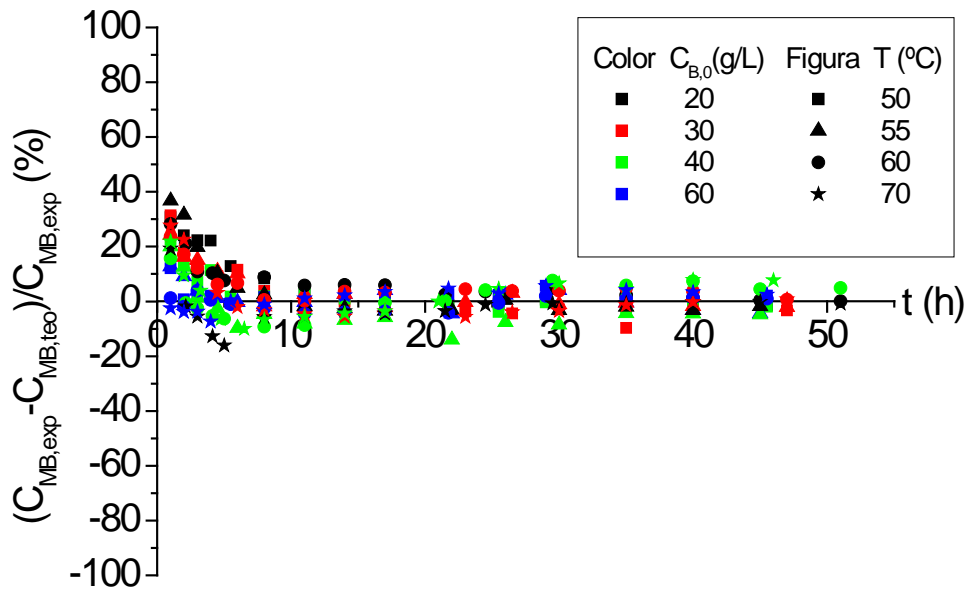


Figura 3.15. Análisis de residuos del Modelo 3

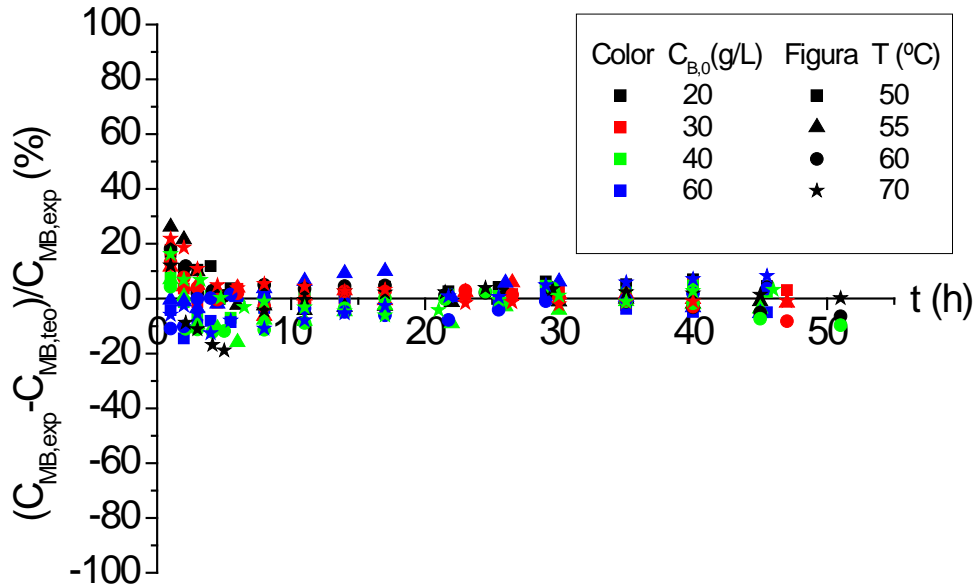


Figura 3.16. Análisis de residuos del Modelo 4

3.3.2. Validación del modelo cinético

El ajuste del modelo 3 a los datos experimentales queda reflejado en las Figuras 3.17 a 3.20. Se aprecia el excelente ajuste del modelo finalmente seleccionado a los datos experimentales a todas las temperaturas y a todas las concentraciones iniciales de ácido benzoico estudiadas.

El modelo cinético elegido (modelo 3) puede utilizarse para simular la actividad remanente de la enzima a un tiempo determinado para unas condiciones dadas de concentración inicial de ácido y temperatura. Como se observa en la Figuras 3.21 y 3.22, son notables las diferencias existentes entre los valores medidos experimentalmente por medio del ensayo hidrolítico de las muestras extraídas directamente del medio de reacción con los valores teóricos predichos por el modelo. Esto se hace más evidente en la temperatura de 70°C (Figura 3.22), donde la desactivación enzimática es más fuerte. La actividad remanente determinada de forma experimental, presenta valores mayores. Una posible razón es que la interacción del centro activo resulte distinta por la naturaleza de los diferentes compuestos involucrados, de manera que la reacción de hidrólisis no se vea afectada de manera tan drástica como la esterificación por el cambio de estructura que tiene lugar al desactivarse la enzima. Así, la enzima no perdería la capacidad de interaccionar con el agua de igual forma que la de interaccionar con la glicerina. Lo mismo podría aplicarse a la unión al éster de o-nitrofenol y ácido butírico y al ácido benzoico, al unirse la enzima a dichos sustratos por el radical acílico o ácido. De hecho, como se observó previamente, al elegir un catalizador para este proceso (apartado 3.1.1), las actividades hidrolítica y sintética son distintas y no proporcionales (Figura 3.1 y Tabla 3.1) (Teng y col., 2007; Hasan y col., 2009). Como en el caso del “screening” de enzimas inicial, la actividad hidrolítica no puede relacionarse directamente con la sintética, y sólo puede tenerse en consideración para determinar que exista o no actividad lipasa, en términos puramente cualitativos.

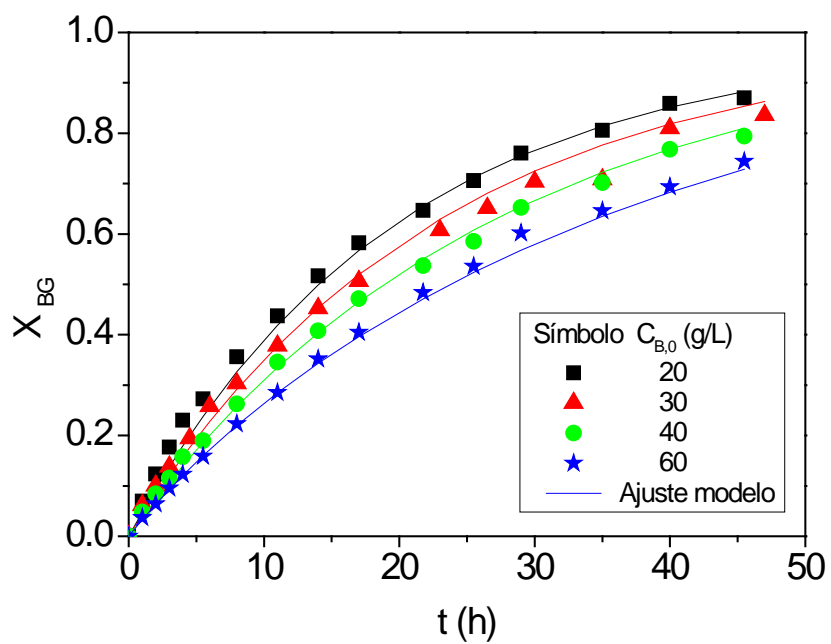


Figura 3.17. Resultados del ajuste del Modelo 4 para T=50°C

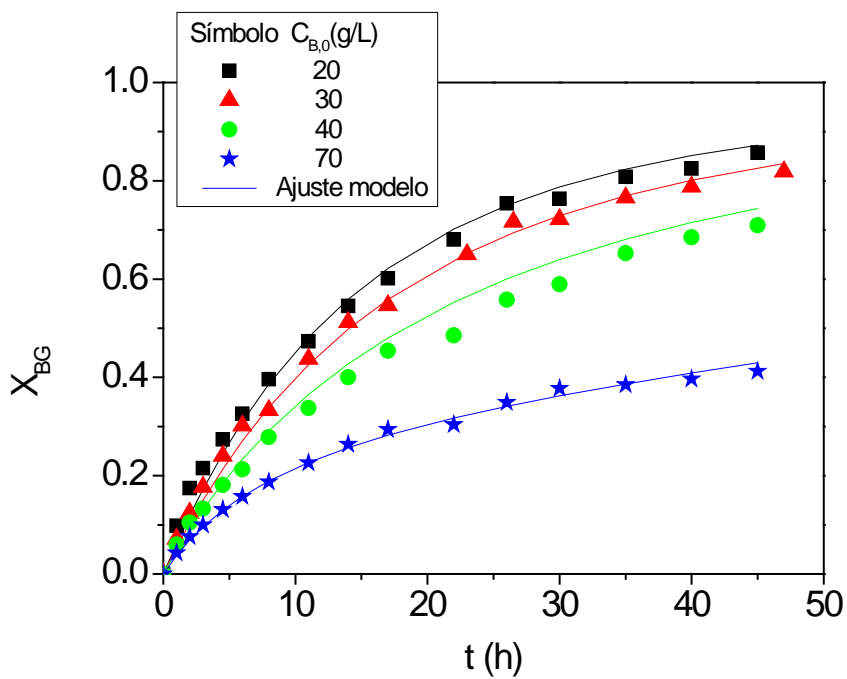


Figura 3.18. Resultados del ajuste del Modelo 4 para T=55°C

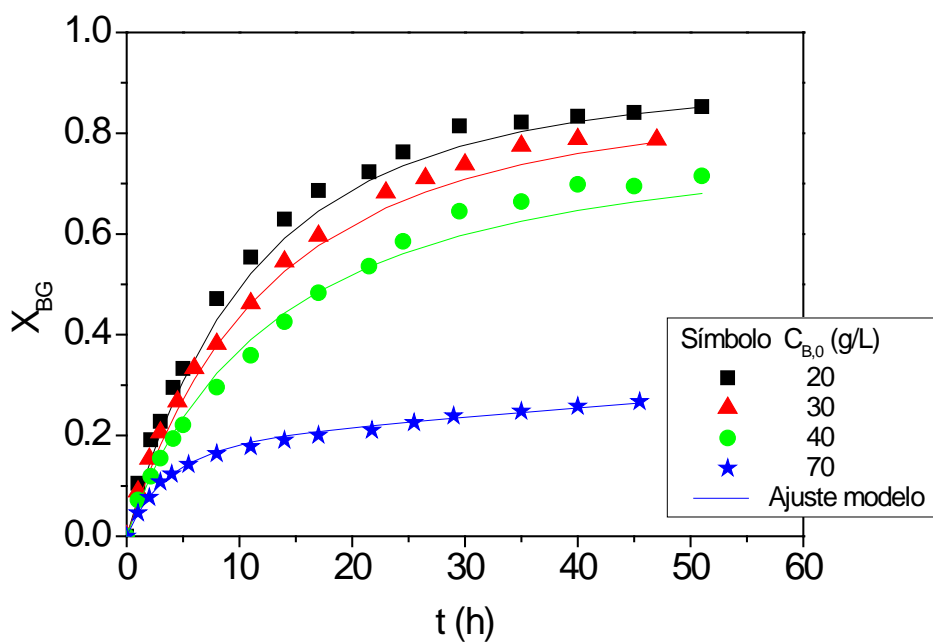


Figura 3.19. Resultados del ajuste del Modelo 4 para T=60°C

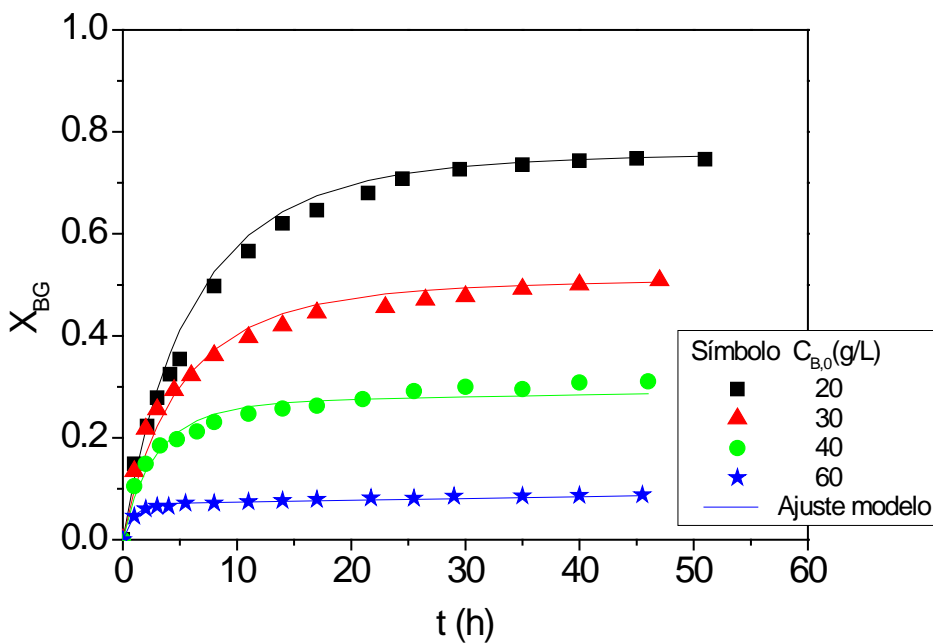


Figura 3.20. Resultados del ajuste del Modelo 4 para T=70°C

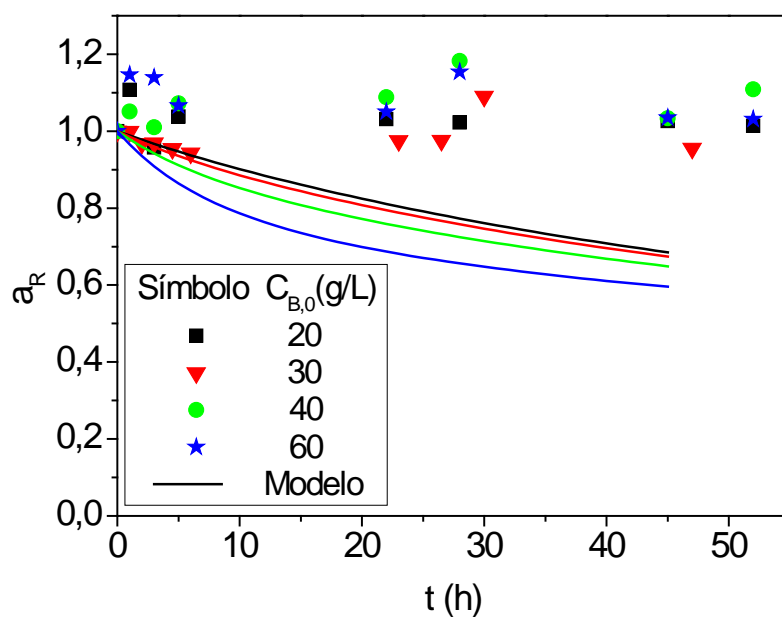


Figura 3.21. Evolución de la actividad de la CALBL en el transcurso de la esterificación de ácido benzoico y glicerina ($T=50^\circ\text{C}$)

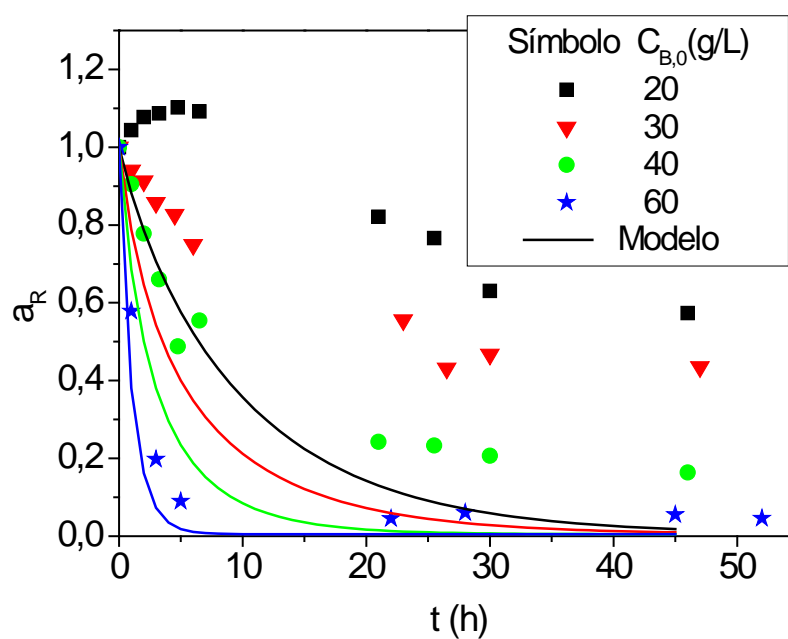


Figura 3.22. Evolución de la actividad de la CALBL en el transcurso de la esterificación de ácido benzoico y glicerina ($T=70^\circ\text{C}$)

3.4. BIBLIOGRAFÍA

- Batovska, D.; T. Kishimoto; V. Bankova; Z. Kamenarska y M. Ubukata (2005). "Synthesis of Some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu Protocol." *Molecules* **10**(3): 552-558.
- Ceni, G.; P. C. da Silva; L. Lerin; R. M. Charin; J. V. Oliveira; G. Toniazzo; H. Treichel; E. G. Oestreicher y D. de Oliveira (2010). "Enzyme-catalyzed production of 1-glyceryl benzoate in compressed n-butane." *Enzyme and Microbial Technology* **46**(6): 513-519.
- Ceni, G.; L. A. Lerin; J. F. de Conto; C. V. Brancher; P. C. da Silva; G. Toniazzo; H. Treichel; D. de Oliveira; J. V. Oliveira; E. G. Oestreicher y O. A. C. Antunes (2009). "Optimization of 1-glyceryl benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents." *Enzyme and Microbial Technology* **46**(2): 107-112.
- Ghanem, A. (2007). "Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds." *Tetrahedron* **63**(8): 1721-1754.
- Hari Krishna, S. y N. G. Karanth (2001). "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547**(2): 262-267.
- Hasan, F.; A. A. Shah y A. Hameed (2009). "Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review." *Biotechnology Advances* **27**(6): 782-798.
- Kato, Y.; I. Fujiwara y Y. Asano (1999). "A novel method for preparation of optically active [α]-monobenzoyl glycerol via lipase-catalyzed asymmetric transesterification of glycerol." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**(22): 3207-3210.
- Kato, Y.; I. Fujiwara y Y. Asano (2000). "Synthesis of optically active [α]-monobenzoyl glycerol by asymmetric transesterification of glycerol." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9**(4-6): 193-200.
- Kim, S. y J. Rhee (1991). "Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **68**(7): 499-503.
- Kobayashi, T.; T. Matsuo; Y. Kimura y S. Adachi (2008). "Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**(11): 1041-1044.
- Korkmaz, S.; Y. Salt; A. Hasanoglu; S. Ozkan; I. Salt y S. Dincer (2009). "Pervaporation membrane reactor study for the esterification of acetic acid and isobutanol using polydimethylsiloxane membrane." *Applied Catalysis A: General* **366**(1): 102-107.
- Ladero, M.; G. Ruiz; B. C. C. Pessela; A. Vian; A. Santos y F. Garcia-Ochoa (2006). "Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme." *Biochemical Engineering Journal* **31**(1): 14-24.
- Leszczak, J.-P. y C. Tran-Minh (1998). "Synthesis of benzoates by enzymatic catalysis in heterogeneous medium." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5**(1-4): 277-281.

- Nazari, K.; A. Mahmoudi; M. Shahrooz; R. Khodafarin y A. A. Moosavi-Movahedi (2005). "Suicide-peroxide inactivation of horseradish peroxidase in the presence of Sodium n-Dodecyl Sulphate: A study of the enzyme deactivation kinetics." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **20**(3): 285-292.
- Ottosson, J. y T. h. i. S. I. f. bioteknologi (2001). "Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis: A Study of Lipase Enantioselectivity", Tekniska högsk.
- Selmi, B.; E. Gontier; F. Ergan y D. Thomas (1997). "Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: lipase regiospecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel." *Biotechnology Techniques* **11**(8): 543-547.
- Shigeru, M. (2003). "Process for preparation of benzoic acid glycerine esters as plasticizers". Japan. **JP 2003055311 (A)**: 7 pp.
- Sun, S.; L. Shan; Y. Liu; Q. Jin; Y. Song y X. Wang (2009). "Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57**(1-4): 104-108.
- Teng, Y. y Y. Xu (2007). "A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent." *Analytical Biochemistry* **363**(2): 297-299.
- Xu, J.-H.; Y. Kato y Y. Asano (2001). "Efficient preparation of (R)-alpha-monobenzoyl glycerol by lipase catalyzed asymmetric esterification: Optimization and operation in packed bed reactor." *Biotechnology and Bioengineering* **73**(6): 493-499.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2006). "Kinetic modeling of microwave-assisted chemoenzymatic epoxidation of styrene", Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. **52**: 1235-1247.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2008). "Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**(17): 7915-7922.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2010). "Lipase-catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach." *Process Biochemistry* **45**(4): 586-592.
- Yahya, A. R. M.; W. A. Anderson y M. Moo-Young (1998). "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions." *Enzyme and Microbial Technology* **23**(7-8): 438-450.
- Yao, C.; S. Tang; J. Zhang y Y. Yu (2002). "Kinetics of lipase deactivation in AOT/isooctane reversed micelles." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **18**(4-6): 279-284.
- Yodo, M.; Y. Matsushita; E. Ohsugi y H. Harada (1988). "Optical Resolution and Chiral Synthesis of Methyl 6,7-Dichloro-2,3-dihydrobenzo[b]furan-2-carboxylate." *Chem. Pharm. Bull.* **36**(3): 902-913.

4.- Esterificación de Glicerina y Ácido Benzoico catalizada por Novozym®435

4. ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA CON ÁCIDO BENZOICO CATALIZADA POR NOVOZYM® 435

En el capítulo 3 se ha estudiado la esterificación de glicerina y ácido benzoico en medio libre de disolvente, y se ha comprobado, además, que se da un importante fenómeno de desactivación de la lipasa B de *Candida antarctica* libre utilizada como catalizador, debido al efecto combinado de la temperatura y la concentración de ácido.

Una de las herramientas más comúnmente utilizadas para solventar el inconveniente de la pérdida de actividad de una enzima es su inmovilización. Esta técnica persigue la fijación del biocatalizador sobre un soporte sólido, ya sea por interacciones físicas (tipo van der Waals) o por unión covalente, activando la superficie del soporte con los grupos funcionales adecuados (aldehídos, ácidos, aminas, etc.) para una inmovilización activa (Sheldon, 2007). En general, las interacciones soporte-proteína favorecen que la estructura de la enzima se mantenga, contribuyendo a darle estabilidad, bien por la fortaleza del enlace entre el soporte y la enzima, bien por un número considerable de interacciones y enlaces entre ambos. En el primer caso, se tiende a utilizar enlaces covalentes entre diferentes grupos funcionales, enlaces fuertes, difíciles de romper, que transmiten la rigidez del soporte a la propia enzima o proteína. En el segundo caso, un gran número de enlaces transmite dicha rigidez estructural, aun siendo cada interacción en sí relativamente débil y, en cualquier caso, casi siempre reversible (interacciones dipolo-dipolo, carga-dipolo, hidrofóbicas, etc.). Esta última estrategia comenzó a plantearse como un enlace multipuntual de tipo covalente, rígido y no reversible en los últimos años noventa, dando lugar a preparados enzimáticos muy estables (Bernal y col., 2013; Poppe y col., 2013). En la última década, la estabilización de enzimas, por sí mismas catalizadores estructuralmente débiles, se ha llevado a cabo utilizando ambas estrategias con una tendencia cada vez mayor hacia las interacciones múltiples de baja o de media intensidad, interacciones y enlaces que son reversibles y que, por tanto, permiten la lixiviación de la enzima ya desactivada para

reemplazarla por nuevas moléculas plenamente activas (Mateo y col., 2000; Addorisio y col., 2013).

Por otra parte, la inmovilización de enzimas y, en general, de biocatalizadores, permite su utilización en procesos en continuo o su reutilización en varios ciclos (Ansari y col., 2012; Itabaiana Jr y col., 2013), siendo la estabilidad y la selectividad de la enzima inmovilizada de suma importancia (José y col., 2013; Jun y col., 2013; Le Joubioux y col., 2013). El proceso de inmovilización permite modular la actividad y la selectividad de la enzima, llegando a modificar la cinética de las reacciones en las que la enzima actúa como catalizador (Ladero y col., 2001; Bhattacharya y col., 2012). De hecho, dependiendo del tipo de inmovilización utilizado, es posible que la actividad específica de la enzima se vea reducida debido al impedimento que significa el transporte de los reactivos a través de los poros del soporte o a la acumulación de enzima en ciertas zonas de la estructura porosa del soporte; acumulación debida a la lenta difusión de la proteína a través de los poros durante el proceso de inmovilización (Ladero y col., 2001; Chen y col., 2007; Itabaiana Jr y col., 2013; Jun y col., 2013).

Novozymes comercializa CALB inmovilizada sobre Lewatit VPOC 1600, una resina catiónica de intercambio iónico de la empresa Lanxess. Este derivado enzimático se empezó a utilizar en la década de los noventa, utilizándose en múltiples procesos de esterificación, amidación, carbonatación y otras reacciones similares (Soledad de Castro y col., 2000; Stevenson y col., 2007; Tufvesson y col., 2007; Bhattacharya y col., 2012; Poulhès y col., 2012). Este preparado enzimático es de mucho interés en la resolución cinética de racémicos (Shuklov y col., 2012), en el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos de polimerización (Kumar y col., 2000; Chen y col., 2007; Frampton y col., 2013), procesos más limpios para la obtención de biodiesel de diferentes orígenes (Gog y col., 2012; José y col., 2013) y nuevos productos derivados de ácidos fenólicos y compuestos afines, con actividades antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas y anticancerígenas (Guyot y col., 1997; Gryglewicz y col., 2000; Stevenson y col., 2007; Lozano y col., 2012; Toledo y col., 2012). Esta enzima, como otras lipasas, ha probado su versatilidad en diversos procesos, con una elevada actividad específica por compuestos de peso molecular medio o alto (no

así para ácidos de cadena corta, como ácido acético). Se puede emplear con diversos disolventes y medios renovables, como dióxido de carbono supercrítico y líquidos iónicos, incluyendo eutécticos profundos, o sin emplear disolvente alguno (condiciones en ausencia de disolvente o “solvent-free”) (Yang y col., 2005; Tufvesson y col., 2007; Lozano y col., 2012; Zhao y col., 2013). Los procesos enzimáticos que utilizan esta lipasa se pueden intensificar mediante ultrasonidos y microondas para algunas aplicaciones (Yadav y col., 2004; Martins y col., 2013). Asimismo, se pueden utilizar varias operaciones distintas para eliminar el agua formada en la reacción o compuestos similares, como alcoholes y aminas, de las reacciones de condensación en las que se emplean estas enzimas (Lozano y col., 2004; Findrik y col., 2012) .

En este capítulo se estudia la utilización de Novozym® 435 como catalizador para la esterificación de glicerina y ácido benzoico en un medio libre de disolventes orgánicos distintos de la propia glicerina, que actúa a la vez de reactivo y disolvente. Para ello se realizará un estudio previo de caracterización y evaluación del biocatalizador, similar al planteado en el capítulo anterior, delimitando las condiciones experimentales más apropiadas, entre 50 y 70 °C de temperatura y la concentración del ácido benzoico disuelto en glicerol (entre 20 y 60 g/L). En los experimentos previos se determinará la influencia de la transferencia de materia externa e interna en experimentos realizados a varias agitaciones y tamaños de partícula, así como el efecto de los productos de la reacción de esterificación sobre la velocidad inicial de la misma. El estudio cinético se llevará a cabo dentro del intervalo de las condiciones de experimentación planteadas previamente (en el capítulo anterior) y en función de los resultados de los experimentos previos ahora realizados. Así, se podrán obtener datos cinéticos utilizables en la discriminación de un modelo cinético que esté de acuerdo con la fenomenología observada en la producción de 1-monobenzoato de glicerol, BG. Finalmente, se profundizará en el efecto de control por parte de la transferencia de materia en los poros y se discutirá el efecto de la distribución y carga de enzima sobre la velocidad observada y el régimen de control cinético correspondiente.

4.1. EXPERIMENTOS PREVIOS

Con el objeto de estudiar las principales variables que afectan a la cinética enzimática utilizando Novozym® 435 y determinar los intervalos experimentales más adecuados, se han realizado los siguientes experimentos previos:

- Caracterización de Novozym® 435.
- Estabilidad del catalizador.
- Estudio de inhibición y/o desactivación de la enzima.

4.1.1. Caracterización de Novozym® 435

Novozym® 435 es un preparado industrial de lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada físicamente, por interacción hidrofóbica múltiple, sobre LEWATIT VP OC 1600, una resina básica macroporosa de intercambio iónico.

Medida de la actividad

Se ha aplicado el procedimiento descrito en los apartados 2.3.2.2 y 2.3.2.3 para determinar la actividad de este derivado enzimático y compararla con la medida en el caso de la enzima libre, CALBL, tanto en reacciones de hidrólisis como de síntesis. Estos resultados se recogen en la Tabla 4.1. Se puede apreciar que la actividad hidrolítica es alta en todas las enzimas en disolución, pero la capacidad de síntesis solo es alta con la isoenzima B de *Candida antarctica*, bien libre (Lipozyme® CALB-L), bien inmovilizada (Novozym® 435).

Tabla 4.1. Actividad de CALBL y diferentes lipasas inmovilizadas en hidrólisis de PNPB y esterificación de glicerina y ácido benzoico.

Derivado	Actividad hidrolítica específica ($\mu\text{mol pNP/min}\cdot\text{gE}$)	Actividad sintética específica ($\mu\text{mol BG/ min}\cdot\text{gE}$)
CALBL	85,27	0,11
Novozym®435	$6\cdot 10^{-3}$	0,05
TLIM	0,181	$2\cdot 10^{-3}$
RMIM	0,063	$8\cdot 10^{-4}$

Medida de la estabilidad

Como se ha comentado anteriormente, la inmovilización es una vía muy útil para conferir mayor estabilidad a una enzima. Para comprobar la utilidad de este proceso sobre la enzima objeto del presente estudio, se ha sometido a la enzima inmovilizada, Novozym® 435, a condiciones elevadas de temperatura (80 °C) durante diferentes tiempos, y se ha evaluado su actividad en la hidrólisis de PNPB. Se ha aplicado el mismo procedimiento que el empleado con la enzima libre. Los resultados se muestran en la Figura 4.1, donde es evidente el efecto positivo de la inmovilización a tiempos largos, ya que la actividad de Novozym® 435 disminuye sólo muy ligeramente a lo largo del tiempo, manteniendo valores elevados, de entre 80-90 % de la actividad hidrolítica inicial de la enzima, durante 170 h, mientras que la actividad remanente de la enzima libre disminuye de forma muy acusada, con una vida media entre 5 y 6 veces inferior a la del preparado inmovilizado. A tiempos cortos, para la enzima en disolución, se observa un incremento en la actividad remanente de CALBL, fenómeno que puede distorsionar la desactivación de la enzima, pero que es propio de algunas enzimas en estado libre y medio acuoso, ya que se puede estar observando la separación de agregados de moléculas de enzima, liberando

el centro activo del catalizador que podía estar oculto al medio de reacción por estar las proteínas formando coágulos reversibles (Ladero y col., 2006).

Por otro lado, se ha sometido a la enzima inmovilizada a desactivación en un medio de glicerina pura a diferentes temperaturas y a tiempos muy prolongados, aprovechando que la glicerina, como otros polialcoholes y azúcares, es un agente estabilizante. Como se puede observar en la Figura 4.2, la enzima Novozym® 435 soporta muy bien condiciones de temperatura elevada durante largo tiempo, demostrando que la inmovilización es una vía muy eficiente para estabilizarla y permitir su uso más intensivo en catálisis, incluso teniendo la posibilidad de su reutilización en varios ciclos de producción en la industria o de su utilización en reactores enzimáticos continuos.

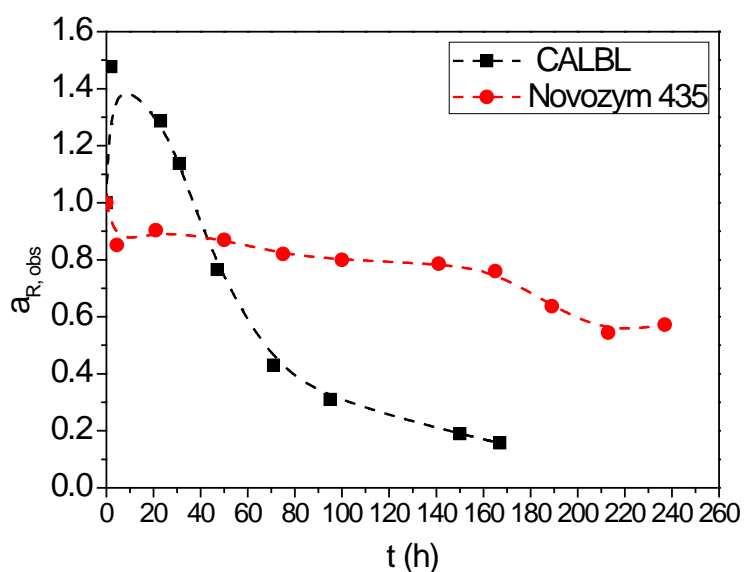


Figura 4.1. Estabilidad CALBL vs. Novozym 435 (Ensayo de hidrólisis de PNPB).

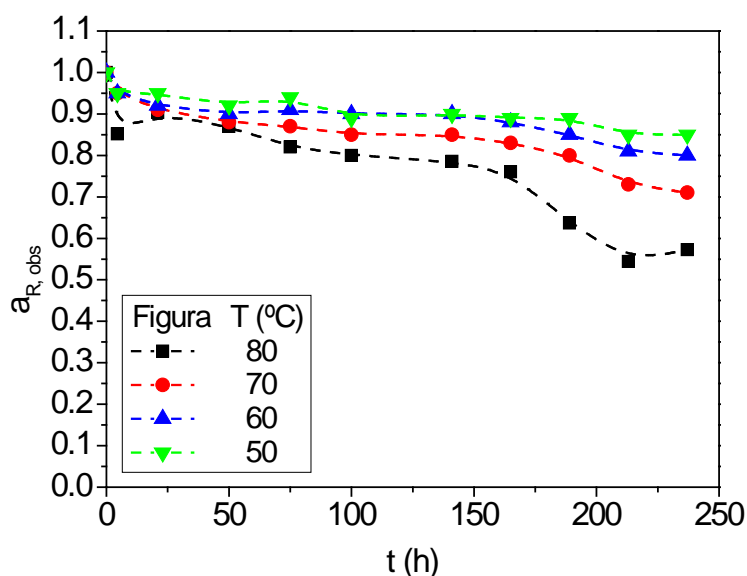


Figura 4.2 Actividad remanente Novozym 435 en medio glicerina frente a tiempo a diferentes temperaturas

Determinación de la estructura

Es importante conocer la estructura del catalizador heterogéneo ya que sus características son determinantes para las posibles interacciones que pueda tener con los reactivos y productos del sistema reaccionante.

Debido a la amplia aplicación de Novozym® 435 en múltiples procesos, existen varios trabajos centrados en su caracterización como catalizador heterogéneo. Entre ellos destaca el trabajo del grupo de Richard Gross (Mei y col., 2002), donde se comprueba, utilizando la técnica de microespectroscopía IR, que la lipasa B de *Candida antarctica* se distribuye en la corteza del soporte, con un espesor de 80 a 100 μm , de forma que aprovecha las zonas de mayor porosidad y accesibilidad cercanas a la superficie de la resina.

Además, por medio de un barrido SEM se determinó que el tamaño medio de poro es de aproximadamente 100 nm, más de 10 veces superior al tamaño de la molécula de CALBL; esta técnica pone de manifiesto las fuertes interacciones intermoleculares existentes entre las moléculas de enzima y entre ellas y la superficie del sólido, que limitan la migración de moléculas de proteína hacia el interior de la partícula en el proceso de inmovilización. Hay que considerar la

facilidad de interacción entre la superficie de la enzima y la del soporte (interacciones hidrofóbicas múltiples) junto con la baja difusividad molecular de la enzima, incluso en medios líquidos con viscosidad baja. Además, las lipasas son proteínas de interfase y su propia superficie tiene varias zonas hidrofóbicas, por lo que también hay formación de coágulos enzimáticos que, a su vez, difunden más lentamente que las enzimas que los conforman (Hossain y col., 1986; Chen y col., 2007).

Se ha estudiado también la distribución de tamaño de partícula que presenta el preparado Novozym® 435, para lo cual se ha utilizado un tamizador automático. En la Figura 4.4 se muestra el resultado de este estudio y se puede comprobar que existe una distribución bastante homogénea, con un tamaño de partícula medio de $0,7 \pm 0,15$ mm.

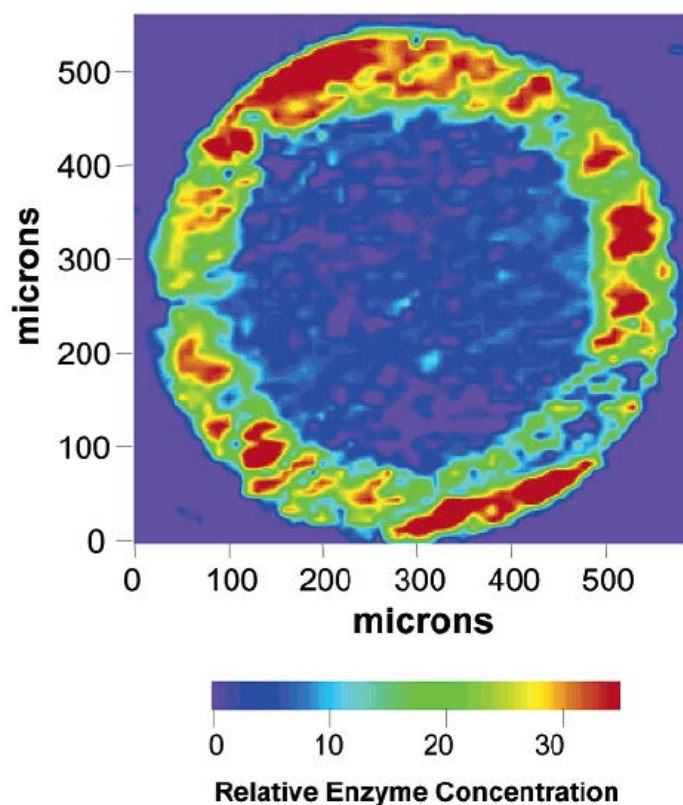


Figura 4.3 Imagen de SEM de partícula de Novozym 435. Indica la distribución a modo de corteza de CALBL sobre el soporte de inmovilización, Lewatit VPOC 1600 (Mei y col., 2002).

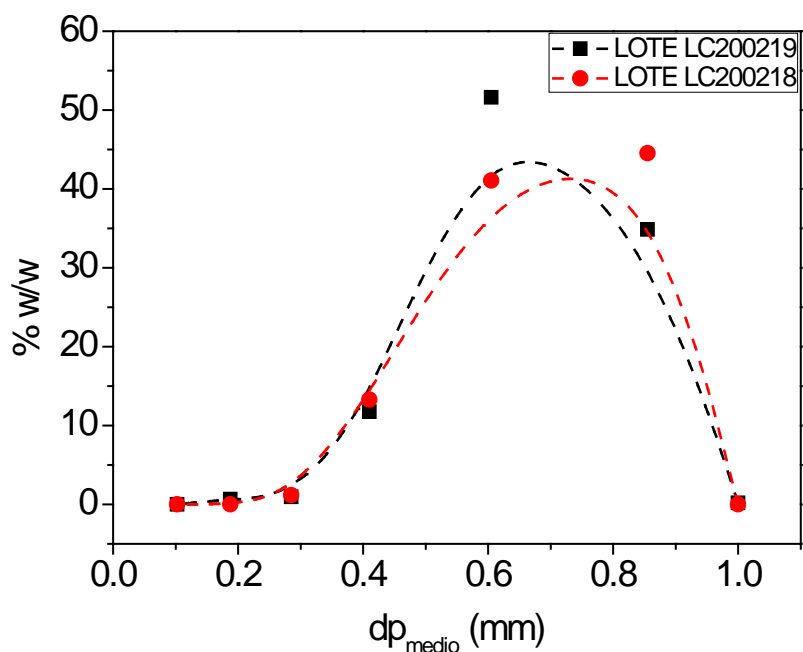


Figura 4.4 Distribución de tamaño de partícula de Novozym® 435

Se ha llevado a cabo también una medida de la superficie específica (BET), calculándose, además, el volumen total de poro mediante el método BHJ. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.2. El detalle de la distribución de tamaño de poro se presenta en la Figura 4.5. En ambos casos se puede observar que el volumen total de poros es menor en la partícula de enzima inmovilizada, lo que se puede explicar con la particular deposición en forma de corteza de la enzima en la superficie externa de la partícula. La porosidad en el interior de la partícula permanece prácticamente igual a la del soporte, mientras que en la superficie se encuentran los aglomerados de moléculas de enzima muy juntos, dando lugar a tamaños de poro pequeños. Esto se puede constatar si se comparan los resultados de microscopía SEM, que se muestran en las Figuras 4.6 y 4.7. A 30000 aumentos se puede observar que la enzima recubre la superficie de la partícula de Lewatit de forma muy compacta, tapando prácticamente la entrada de los poros. Las moléculas de CALB, al inmovilizarse, interaccionan de forma intensa y forman aglomerados, impidiendo su penetración al interior de la partícula, algo que se traduce en bocas de poro de tamaño muy pequeño, como se puede comprobar en la zona de tamaño de poro bajos del análisis del tamaño de poro por desorción de nitrógeno.

En cualquier caso, se ha podido comprobar que el orden de magnitud del tamaño de poro medio obtenido experimentalmente por la técnica de Barret, Joyner y Halenda (BJH) está muy cercano al descrito en la bibliografía (Huang y col., 2014). Esto implica que la pérdida de volumen de poro debida a la inmovilización es similar en todos los tamaños de poro (como sugiere, por otra parte, la comparación de las micrografías SEM de la resina VP OC 1600 y de la enzima inmovilizada en dicha resina).

Tabla 4.2. Resultados de análisis de partícula porosa (Lewatit VPOC 1600 y Novozym®435. Superficie específica BET y volumen total de poro BJH.

Sólido	S_g (m^2/g)	V_p (mL/g)
Lewatit VPOC 1600	81,9	0,49
Novozym®435	79,8	0,30

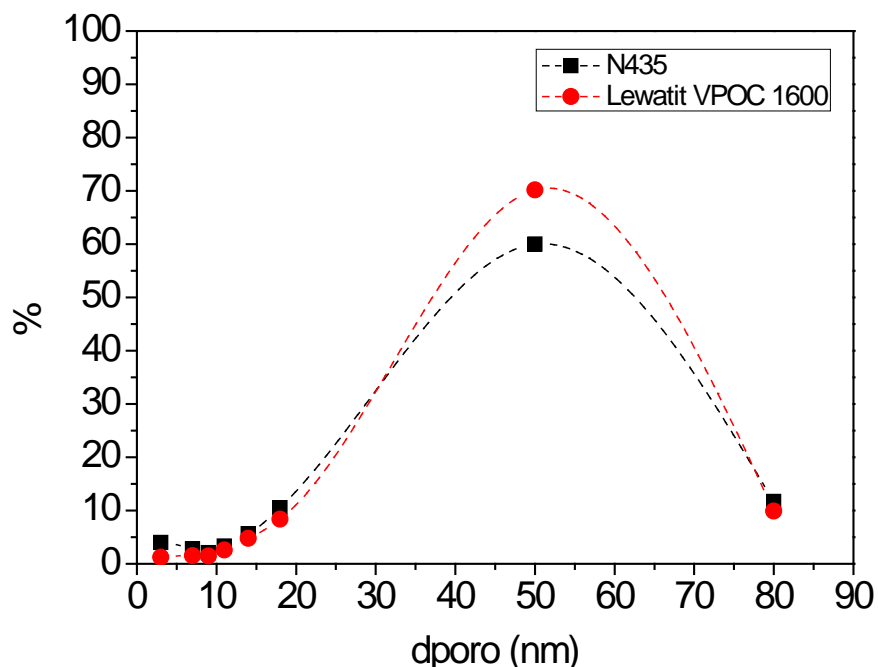


Figura 4.5. Distribución de tamaño de poro en la partícula de soporte (Lewatit VPOC 1600) y de Novozym 435.

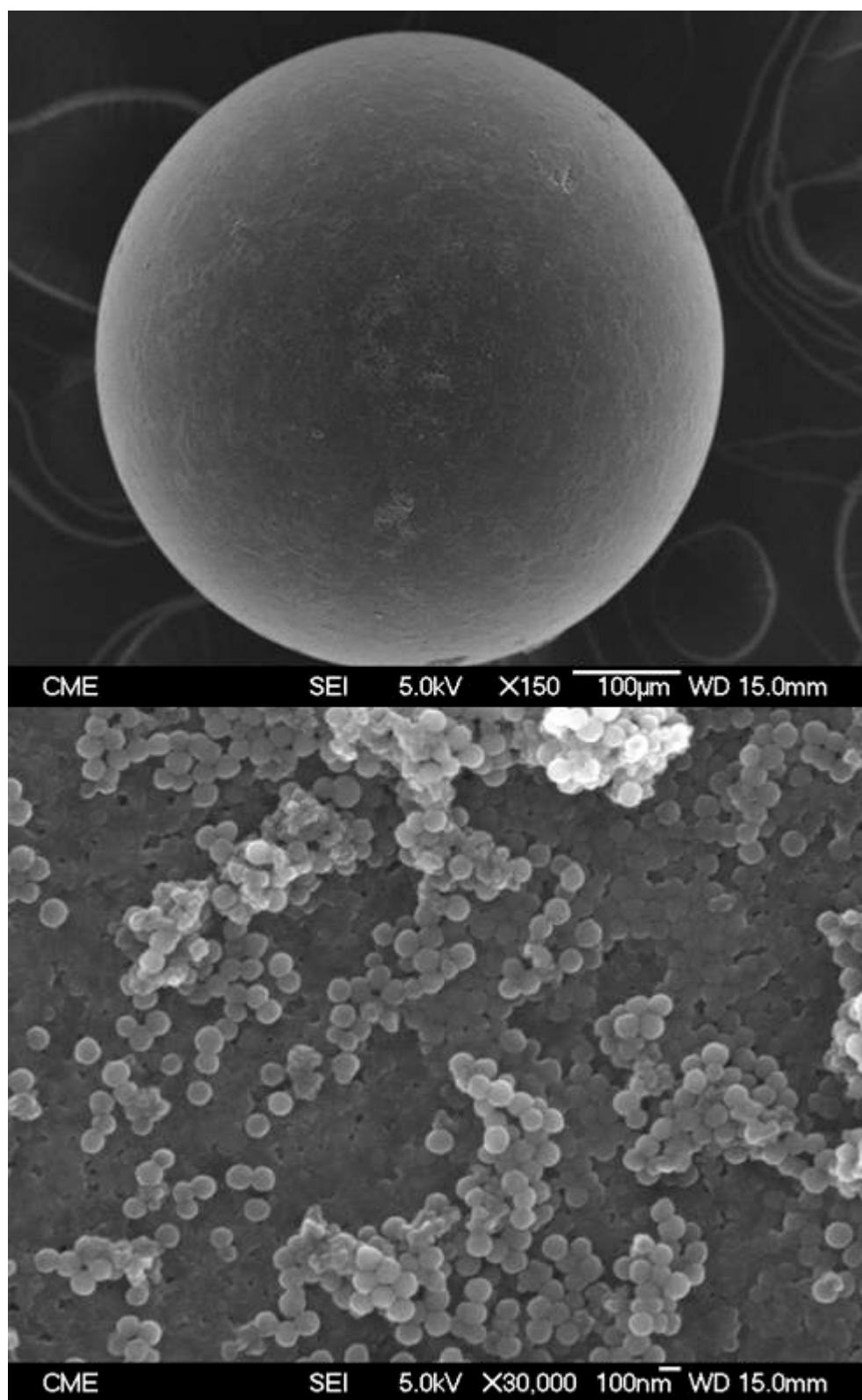


Figura 4.6. Imagen de microscopía SEM de partícula de soporte (Lewatit VPOC 1600) a 150 y 30000 aumentos

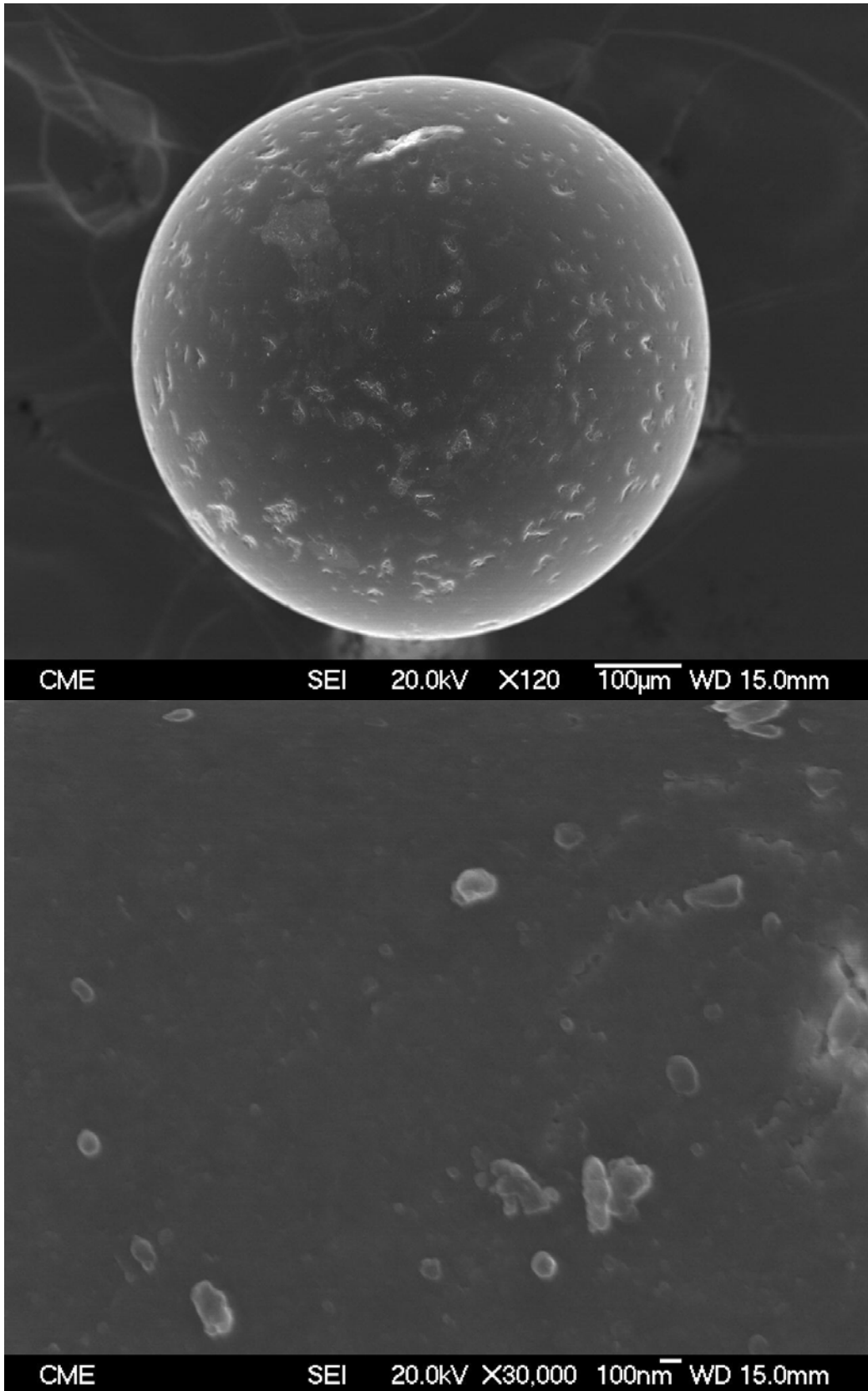


Figura 4.7. Imagen de microscopía SEM de partícula de Novozym®435 a 120 y 30000 aumentos

4.1.2. Efecto de la concentración de ácido benzoico y de la temperatura

En general, la temperatura y la concentración de los reactivos tienen un efecto positivo sobre la velocidad de una reacción química. Sin embargo, en el Capítulo 3 de este trabajo, se ha comprobado el efecto notoriamente desactivante que tiene la combinación de estos dos factores sobre la enzima CALB en la esterificación de ácido benzoico y glicerina. Como se ha podido apreciar en el apartado 4.1.1, la inmovilización de la enzima le confiere una gran estabilidad térmica en glicerina, pero es necesario estudiar el fenómeno de desactivación por parte del ácido. La Figura 4.8 muestra los resultados obtenidos de la velocidad de reacción inicial para diferentes condiciones de concentración de ácido benzoico (de 30 a 60g/L) y temperaturas entre 50 y 70 °C. Se puede observar una tendencia de tipo curva de saturación al aumentar la concentración inicial de ácido y valores de velocidad inicial de reacción mayores cuanto mayor es la temperatura de trabajo. Estos resultados descartan que, por vía química, esté teniendo lugar un fenómeno de desactivación del biocatalizador. Además, tal como ocurrió en la búsqueda de un modelo cinético para la producción de BG con enzima libre, se puede pensar que dicho modelo sea de tipo Michaelis-Menten para esta reacción química.

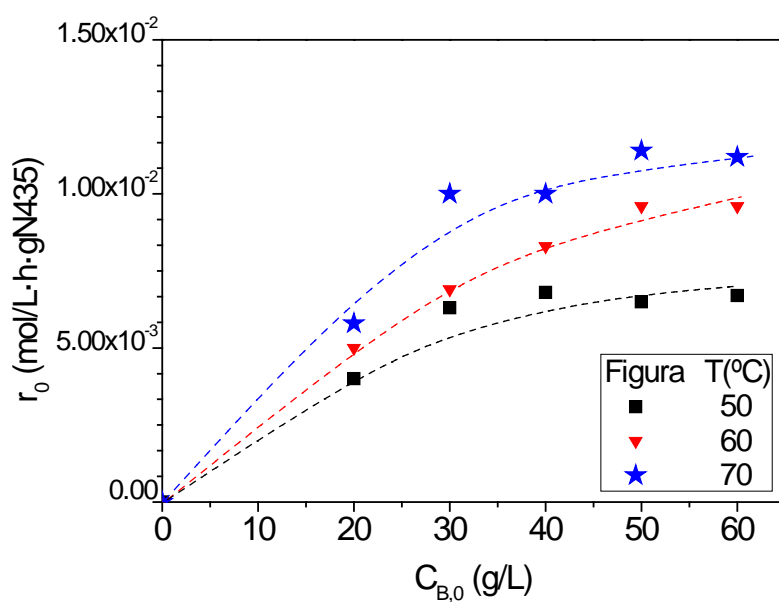


Figura 4.8. Efecto del concentración de ácido benzoico y de la temperatura sobre la velocidad de reacción en su esterificación con glicerina, a diferentes condiciones de temperatura ($C_E=30\text{gN435/L}$).

4.1.3. Estudio de la inhibición por productos

De la misma forma que en el Capítulo 3 de este trabajo se comprobó la ausencia de inhibición enzimática por parte de reactivos o productos y la existencia de una fuerte desactivación por efecto del ácido benzoico y la temperatura, es necesario comprobar la presencia de estos fenómenos en la esterificación de glicerina y ácido benzoico catalizada por la enzima inmovilizada, Novozym® 435.

En las Figuras 4.9 y 4.10, se puede observar que la presencia de los productos de esterificación no tiene un efecto negativo sobre la velocidad de la reacción. Más bien al contrario, cuanto mayor es la concentración inicial de monoéster o agua, mayor resulta la velocidad de reacción. Este hecho es más evidente si se aplica el método de velocidades iniciales y se las enfrenta a las concentraciones iniciales utilizadas de cada producto en cada serie de experimentos (ver Figura 4.11 y 4.12). En ambos casos, la tendencia creciente de la relación velocidad de reacción con la concentración de productos es muy clara. Esta observación es de especial interés en el caso del agua, ya que la glicerina de uso industrial viene generalmente acompañada de agua, en ocasiones en cantidades cercanas al 10 % (glicerol proveniente del proceso de obtención de biodiesel, por ejemplo). En estas condiciones, la velocidad inicial de reacción se ve incrementada en un 50 % en comparación con la observada cuando el medio es glicerina pura.

Lejos de perjudicar el equilibrio y, con ello, la conversión a monoéster, la presencia de una mayor concentración de los productos afecta positivamente la cinética de la esterificación. Esto puede ser debido a que reducen de forma significativa la viscosidad del medio, favoreciendo los fenómenos de transporte, algo que a diferencia del sistema con catálisis homogénea (CALBL), es muy importante en reacciones que operan con un catalizador heterogéneo, como es el caso de Novozym® 435. Esta mejora se observa especialmente en la velocidad inicial de reacción en comparación con el caso en que inicialmente no hay productos de reacción. Luego, el propio transcurrir de la reacción los genera y las conversiones se van igualando. Este hecho se observa en especial para la velocidad de formación del éster. En las condiciones de trabajo, el agua producida (un máximo del 0,7 % en peso en los experimentos expuestos en la

presente Memoria), tendrá un efecto apenas perceptible, mientras que la adición de este producto en concentraciones muy superiores tendrán un efecto muy apreciable sobre la velocidad de reacción y, por tanto, sobre la conversión.

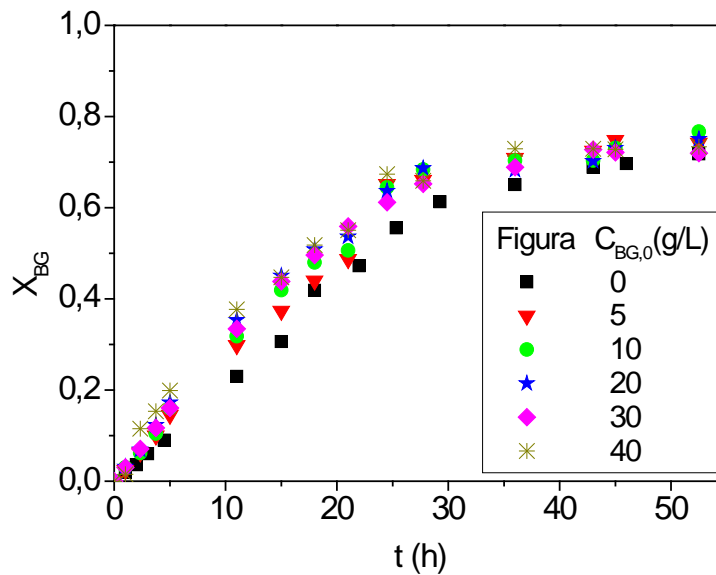


Figura 4.9. Conversión de BG en función del tiempo de reacción a distintas concentraciones iniciales de monoéster. Condiciones: $T=60^{\circ}C$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=30$ g/L

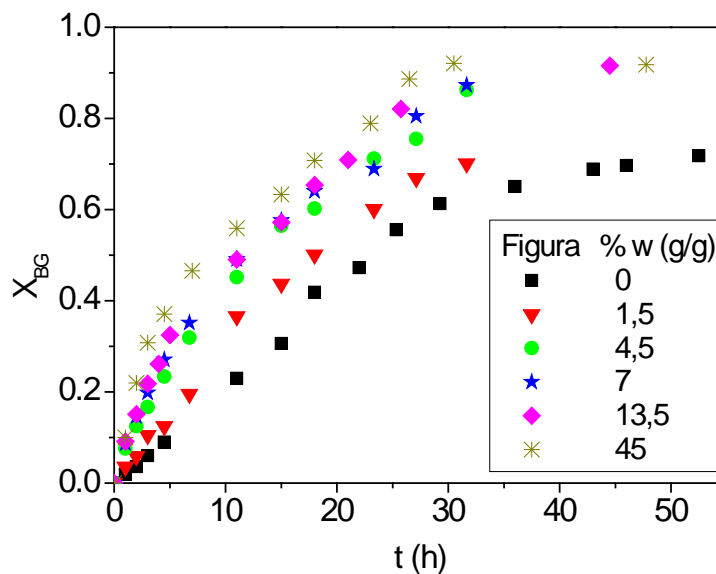


Figura 4.10. Conversión de BG en función del tiempo de reacción a distintas concentraciones iniciales de agua. Condiciones: $T=60^{\circ}C$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=30$ g/L

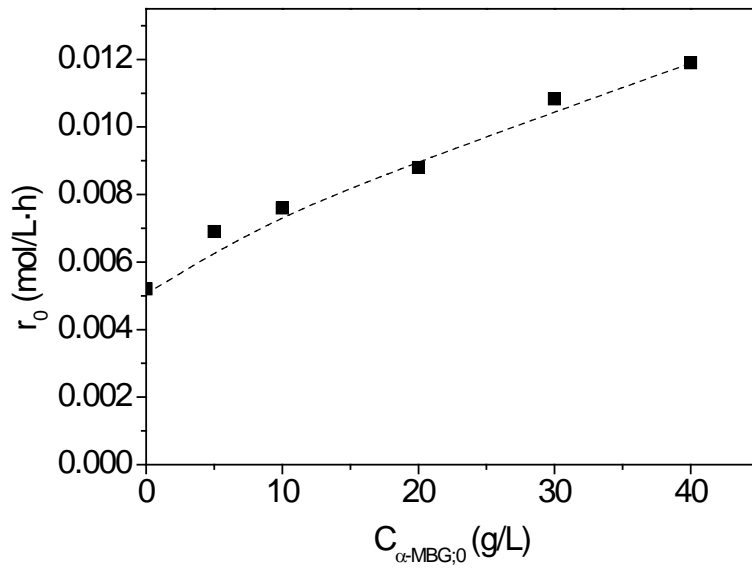


Figura 4.11. Velocidad inicial de reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina frente a concentración inicial de agua en el medio de reacción.
Condiciones: $T=60^\circ\text{C}$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=30$ g/L

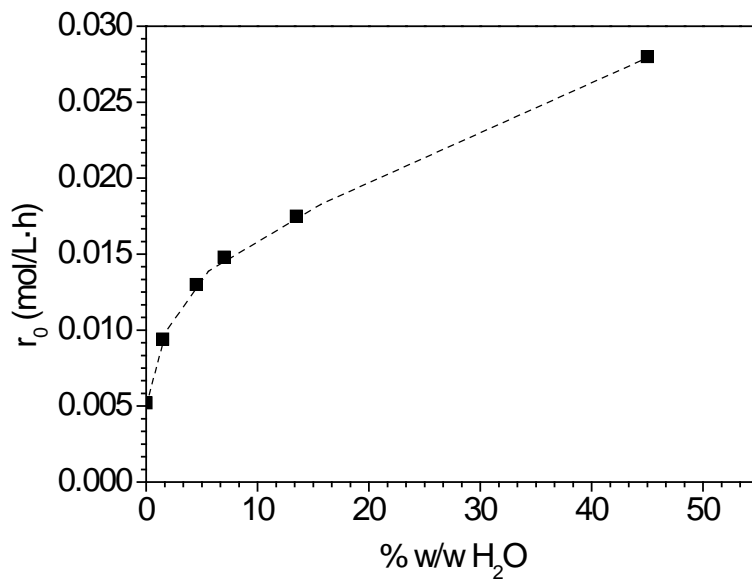


Figura 4.12. Velocidad inicial de reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina frente a concentración inicial de agua en el medio de reacción.
Condiciones: $T=60^\circ\text{C}$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=30$ g/L

4.1.4. Estudio de la transferencia de materia

Como es bien sabido, y ha quedado patente en el punto 4.1.2, los fenómenos de transferencia de materia tienen una gran importancia en reacciones catalizadas por sólidos. De forma general, se buscan condiciones en las que se eliminen las posibles limitaciones al transporte. Sin embargo, hay casos, como el que se trata en este trabajo, en los que las características propias del sistema lo impiden. El propio concepto de medio libre de disolventes y el limitado intervalo de temperaturas hábiles para la estabilidad del biocatalizador, así como la escasa solubilidad del ácido benzoico en glicerina, hacen imprescindible un estudio más detallado de las condiciones de transporte en las que está teniendo lugar el proceso de esterificación.

Para comprobar experimentalmente la existencia de posibles limitaciones al transporte de materia, se han llevado a cabo una serie de experimentos en los que se estudia la influencia de la velocidad de agitación, que puede dar cuenta de problemas difusionales en la película externa a la partícula sólida, y otros en los que se estudia el efecto del tamaño de partícula, donde se puede comprobar los problemas de transporte en el interior de la matriz porosa.

Transporte Externo

En la Figura 4.13 se puede apreciar que, dentro de un intervalo bastante amplio de velocidad de giro del agitador magnético (entre 50 a 750 rpm), no hay prácticamente diferencias en los resultados obtenidos. Solo en ausencia total de agitación ($N = 0$) se aprecia una menor velocidad de transformación. Esto es debido a la ausencia de mezcla que puede estar provocando que la concentración de los productos aumente cerca del centro activo de la enzima, desplazando el equilibrio de la reacción de esterificación hacia los reactivos. Una suave agitación resulta suficiente para mantener el sistema homogéneo y asegurar una velocidad de transferencia de materia en la interfase líquido-sólido suficientemente alta. Por otro lado, si se aplica el método de velocidades iniciales, se comprueba que un aumento en la velocidad de agitación no implica un incremento en la velocidad de la reacción (Figura 4.14). Las mayores

velocidades de esterificación al operar por encima de 600 rpm, se puede deber a la ruptura de las partículas de sólido que generan partículas más pequeñas con mayores cantidades de enzima accesibles para catalizar la transformación, como se estudia más adelante.

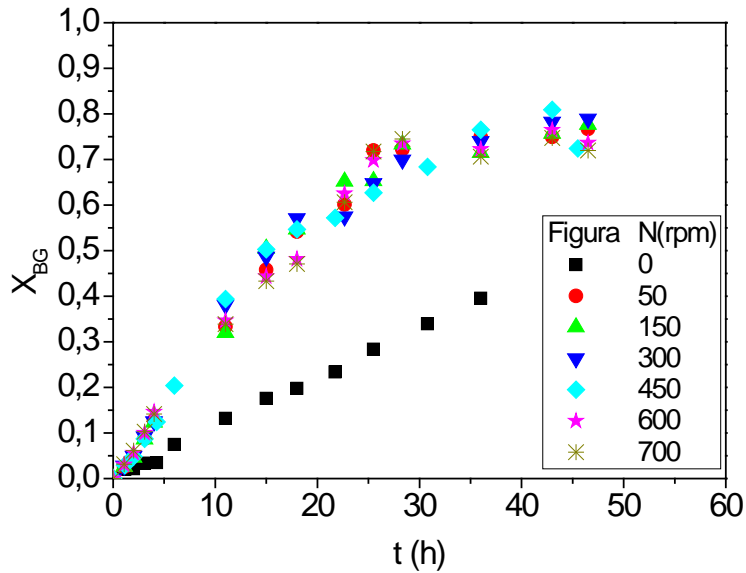


Figura 4.13. Conversión de BG en función del tiempo de reacción a distintas velocidades de agitación. Condiciones: $T=60^{\circ}\text{C}$; $C_{B,0}=30\text{ g/L}$ y $C_E=30\text{ g/L}$

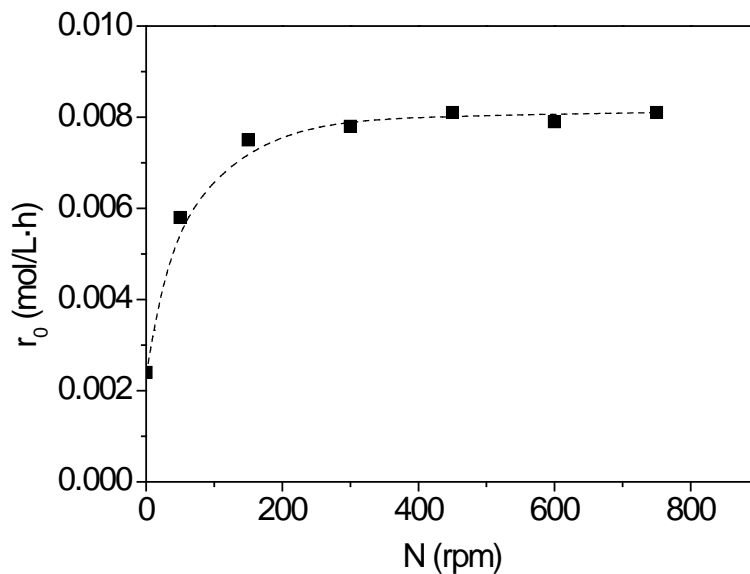


Figura 4.14. Velocidad inicial de reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina frente a velocidad de agitación del medio de reacción. Condiciones: $T=60^{\circ}\text{C}$; $C_{B,0}=30\text{ g/L}$ y $C_E=30\text{ g/L}$

Transporte interno

Como paso previo a este estudio, ha sido necesaria una molienda del derivado inmovilizado comercial y una separación por tamizado para obtener fracciones del tamaño de partícula medio hasta por debajo de 50 μm de diámetro y a los que se hace referencia en los resultados.

La Figura 4.15 muestra la evolución de la conversión del monoéster cuando se emplean diferentes tamaños de partícula de catalizador. Se puede observar que, a menor diámetro de partícula, el producto aparece a una mayor velocidad. Este hecho es más claro si, de nuevo, se aplica el método de velocidades iniciales. En la Figura 4.12 se puede comprobar que, a medida que disminuye el tamaño de partícula, la velocidad de reacción aumenta de forma tan significativa que a tamaños de alrededor de 75 μm incluso se acercan a los observados para la reacción con la enzima libre, donde las limitaciones al transporte de materia son nulas, y que puede considerarse como las condiciones en las que el factor de efectividad es la unidad (control cinético debido a la reacción química). Se ha intentado acercarse a este valor de forma experimental reduciendo hasta el extremo práctico el tamaño de la partícula de Novozym®435, y se ha observado que las condiciones extremas de molienda afectan la integridad de la enzima, perjudicando su funcionamiento en la reacción, de ahí que se observen velocidades menores a las esperadas al romper la partícula de Novozym® 435 por debajo de los 30 μm (desactivación mecánica).

Teniendo todo esto en cuenta se puede determinar un factor de efectividad, definido como sigue:

$$\eta = \frac{r_{\text{observada}}}{r_{\text{formal}}} \quad [4.1]$$

De forma que para una reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina en las siguientes condiciones de operación: $T = 60\text{ }^\circ\text{C}$; $C_{B,0} = 30\text{g/L}$; $C_E = 30\text{g/L}$) y un para catalizador en sus condiciones comerciales ($d_P = 0,65\text{ }\mu\text{m}$), aplicando la ecuación 4.1, se puede calcular su factor de efectividad, que resulta

$$\eta = \frac{0,006}{0,024} = 0,45$$

Este valor es significativo, ya que es un indicio de la importancia que puede tener la difusión interna en el sistema objeto de este trabajo. Incluso se puede pensar que el proceso puede estar operando en condiciones de control mixto de reacción química y transporte interno. Es un aspecto que hay que tener muy en cuenta para la elección de nuevas estrategias para el desarrollo del proceso de producción del monoéster.

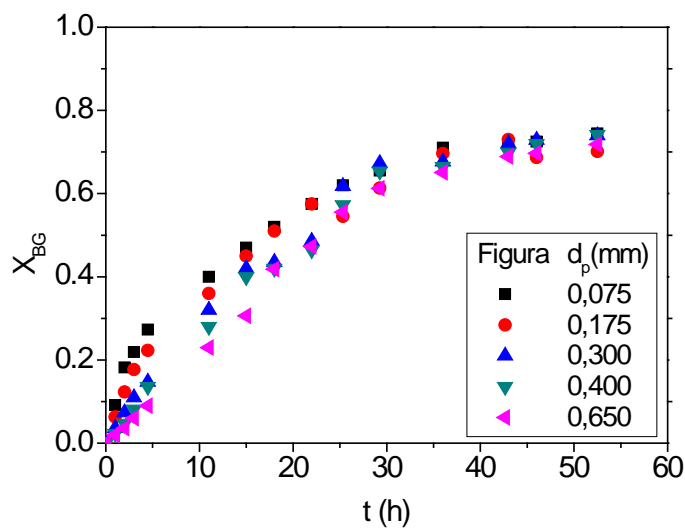


Figura 4.15. Conversión de BG en función del tiempo de reacción a distintos tamaños de partícula del catalizador (Novozym®435). Condiciones: $T=60^{\circ}\text{C}$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=30$ g/L

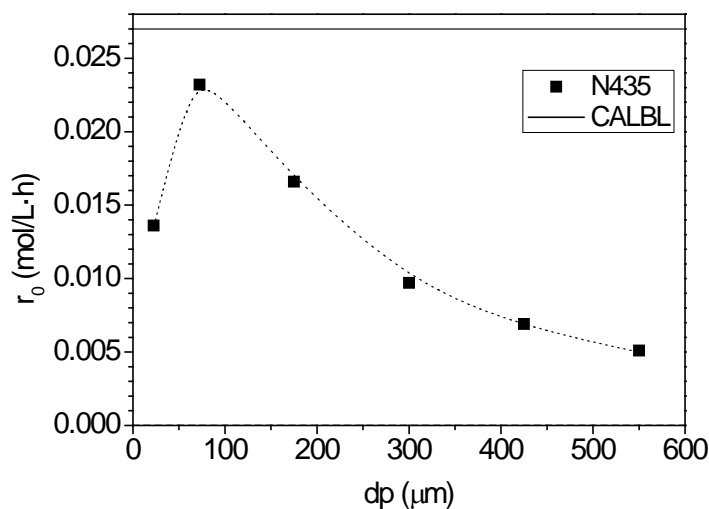


Figura 4.16. Velocidad inicial de reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina frente a distintos tamaños de partícula del catalizador (Novozym®435). Condiciones: $T=60^{\circ}\text{C}$; $C_{B,0}=30$ g/L y $C_E=30$ g/L

4.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS CINÉTICOS

En el estudio cinético se ha mantenido el intervalo de condiciones estudiado con la enzima libre, teniendo en cuenta las limitaciones que plantea la solubilidad del ácido y la temperatura, que es un factor a tener en cuenta si se pretende evitar en la medida de lo posible la desactivación del catalizador. En consecuencia, se ha realizado una serie de experimentos con el objetivo de determinar un modelo cinético que explique la evolución temporal del sistema. Las condiciones de los experimentos se recogen en la Tabla 4.3. Los resultados experimentales se presentan en cuatro tablas, una para cada una de las temperaturas estudiadas (Tablas 4.4 a 4.6).

Tabla 4.3. Condiciones de operación de los experimentos esterificación de ácido benzoico con glicerina catalizada por Novozym®435 (N=250 rpm; $C_E=30$ g/L)

Experimento	T (°C)	$C_{B,0}$ (g/L)
N1	50	30
N2	50	40
N3	50	50
N4	50	60
N5	60	30
N6	60	40
N7	60	50
N8	60	60
N9	70	30
N10	70	40
N11	70	50
N12	70	60

Tabla 4.4. Resultados de los experimentos N1 a N4 (T=50°C)

N1	$C_{B,0} = 30 \text{ g/L}$		N2	$C_{B,0} = 40 \text{ g/L}$	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG} (M)$	X_{BG}
0	0,000	0,00	0	0,000	0,00
1	0,009	0,04	1	0,006	0,02
2	0,012	0,05	2,33	0,010	0,03
3,5	0,020	0,08	3,5	0,021	0,07
5	0,036	0,15	5	0,034	0,11
10	0,059	0,23	10	0,069	0,22
13	0,074	0,30	13	0,087	0,28
18	0,089	0,36	18	0,105	0,33
19,75	0,106	0,43	21	0,128	0,41
23,5	0,128	0,52	25	0,155	0,50
28,25	0,139	0,56	28	0,167	0,54
34	0,158	0,61	34	0,190	0,61
38	0,169	0,65	38	0,205	0,66
44	0,172	0,70	45	0,218	0,70
51	0,174	0,70	51,87	0,225	0,72

Tabla 4.5. Resultados de los experimentos N1 a N4 (T=50°C) (continuación)

N3	$C_{B,0} = 50 \text{ g/L}$		N4	$C_{B,0} = 60 \text{ g/L}$	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG} (M)$	X_{BG}
0	0,001	0,00	0	0,002	0,01
1	0,004	0,01	1	0,005	0,01
2	0,007	0,02	2,33	0,006	0,01
3,5	0,019	0,05	3,5	0,017	0,04
5	0,029	0,08	5	0,035	0,07
10	0,074	0,21	10	0,089	0,18
13	0,094	0,27	13	0,113	0,24
18	0,114	0,32	18	0,137	0,29
19,75	0,138	0,39	21	0,189	0,40
23,5	0,156	0,45	25	0,217	0,46
28,25	0,183	0,52	28	0,235	0,50
34	0,209	0,59	34	0,260	0,54
38	0,225	0,64	38	0,283	0,59
44	0,233	0,67	45	0,300	0,63
51	0,255	0,73	51,867	0,317	0,67

Tabla 4.6. Resultados de los experimentos N5 a N8 (T=60°C)

N5	$C_{B,0} = 30 \text{ g/L}$		N6	$C_{B,0} = 40 \text{ g/L}$	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG} (M)$	X_{BG}
0	0,000	0,00	0	0,000	0,00
1,16	0,007	0,03	1	0,003	0,01
2	0,011	0,05	2	0,011	0,04
3,08	0,020	0,09	3,5	0,025	0,08
4,25	0,028	0,12	5	0,040	0,13
6	0,047	0,20	10	0,078	0,25
10	0,064	0,28	13	0,099	0,32
13	0,080	0,35	18	0,118	0,39
18	0,096	0,42	19,75	0,142	0,47
21,75	0,108	0,47	23,5	0,167	0,55
25,5	0,143	0,63	28,25	0,189	0,62
30,8	0,156	0,68	34	0,207	0,68
34	0,162	0,71	38	0,221	0,72
38	0,173	0,75	44	0,228	0,75
45,5	0,166	0,72	51	0,238	0,78

Tabla 4.7. Resultados de los experimentos N5 a N8 (T=60°C) (continuación)

N7	50 g/L		N8	60 g/L	
t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}	t (h)	C _{BG} (M)	X _{BG}
0	0,000	0,00	0	0	0
1	0,005	0,01	1	0,007	0,01
2,5	0,014	0,04	2	0,016	0,03
4	0,031	0,08	3,5	0,034	0,07
5,5	0,054	0,14	5	0,049	0,11
10	0,089	0,24	10	0,100	0,21
13	0,1138	0,30	13	0,131	0,27
18	0,1365	0,36	18	0,165	0,34
22	0,165	0,44	19,75	0,174	0,37
25,5	0,191	0,51	23,5	0,220	0,46
30	0,218	0,59	28,25	0,263	0,54
34	0,244	0,65	34	0,291	0,61
38	0,262	0,70	38	0,325	0,67
46	0,284	0,76	44	0,350	0,73

Tabla 4.8. Resultados de los experimentos N9 a N12 (T=70°C)

N9	$C_{B,0} = 30 \text{ g/L}$		N10	$C_{B,0} = 40 \text{ g/L}$	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG} (M)$	X_{BG}
0	0,000	0,00	0	0,000	0,00
1,16	0,011	0,05	1,13	0,006	0,02
2	0,018	0,08	2	0,017	0,05
3,08	0,030	0,13	3	0,029	0,09
4,25	0,043	0,19	4	0,056	0,16
6	0,060	0,26	10	0,096	0,28
10	0,074	0,32	13	0,122	0,35
13	0,092	0,39	18	0,145	0,42
18	0,109	0,47	21	0,192	0,56
21,75	0,142	0,62	24,5	0,210	0,62
25,5	0,171	0,74	28,5	0,242	0,71
30,8	0,180	0,78	34	0,248	0,73
34	0,178	0,77	38	0,264	0,77
38	0,187	0,81	44,5	0,268	0,79
45,5	0,180	0,78	--	--	--

Tabla 4.9. Resultados de los experimentos N9 a N12 (T=70°C) (continuación)

N11	$C_{B,0} = 50 \text{ g/L}$		N12	$C_{B,0} = 60 \text{ g/L}$	
t (h)	$C_{BG}(M)$	X_{BG}	t (h)	$C_{BG} (M)$	X_{BG}
0	0,000	0,00	0	0,000	0,00
1,16	0,015	0,03	1	0,008	0,02
2	0,024	0,05	2	0,010	0,02
3,08	0,035	0,08	3,5	0,033	0,07
4,25	0,056	0,12	6	0,060	0,12
6	0,075	0,17	10	0,123	0,24
10	0,114	0,25	13	0,157	0,30
13	0,145	0,32	18	0,189	0,37
18	0,174	0,39	21,5	0,229	0,45
21,75	0,223	0,50	25,5	0,271	0,53
25,5	0,262	0,59	29,5	0,315	0,62
30,8	0,296	0,66	34	0,342	0,67
34	0,309	0,69	38	0,367	0,72
38	0,330	0,74	46,3	0,407	0,80
45,5	0,358	0,80	54,5	0,432	0,85

4.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.3.1. Determinación del modelo cinético

Se han propuesto diversos modelos cinéticos para la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina, considerada como una reacción simple. Se ha buscado un modelo que se ajuste a los resultados experimentales y que represente los fenómenos que están teniendo lugar en el proceso. Para la discriminación entre los diferentes modelos se han aplicado criterios físicos y estadísticos de una forma descrita en trabajos anteriores (Garcia-Ochoa y col., 1990; Ladero y col., 2011).

En el Capítulo 3 de este trabajo se ha descrito como, partiendo del mecanismo “Ping-pong Bi-bi”, generalmente aceptado para la esterificación o trans-esterificación con lipasas (Ecuación 3.1), y en condiciones de exceso del alcohol, la expresión que mejor puede explicar la cinética de la producción de monobenzoato de glicerina es de tipo Michaelis-Menten monosustrato. Este modelo se corresponde con la Ecuación 4.2, aceptando que la concentración de glicerina, dado su gran exceso, permanece prácticamente constante:

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B} \quad [4.2]$$

A diferencia de lo observado al utilizar CALBL como catalizador de la reacción, donde la enzima libre sufre una fuerte desactivación térmica y química, los experimentos previos permiten descartar, al menos en principio, que tanto la temperatura como la concentración del ácido benzoico puedan estar teniendo una influencia negativa sobre la estabilidad de la enzima inmovilizada.

Sin embargo, al estudiar las posibles limitaciones al transporte de materia en el proceso, se ha podido comprobar que, en el intervalo de condiciones de trabajo, puede existir un control mixto de la reacción entre la etapa química y el transporte interno, mientras que la resistencia al transporte externo parece despreciable.

De forma general, el flujo de materia de un compuesto i a través de un espacio infinitesimal, dx , de un poro de sección transversal S , se puede expresar aplicando la Ley de Fick (Ecuación 4.3):

$$j_i = -D_e * \nabla C_i \quad [4.3]$$

donde D_e es el coeficiente de difusión efectivo del compuesto i .

En el caso extremo en el que las limitaciones al transporte sean muy elevadas, la etapa física de transporte de materia será la limitante, de modo que siendo la diferencia de concentración la fuerza impulsora, la velocidad de reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina será directamente proporcional a esta fuerza impulsora, de la misma forma en que afecta al flujo de materia. Este supuesto implicaría, por tanto, un orden de reacción uno.

En este capítulo, se ha trabajado con estas dos posibles vías probando los siguientes modelos cinéticos:

Modelo 1:

Se trata de la expresión de Michaelis-Menten que, como se ha explicado anteriormente, será válido para representar la evolución de las especies en la esterificación de ácido benzoico y glicerina, siempre y cuando no exista desactivación del biocatalizador, tal como se espera a la vista de los resultados de los experimentos previos.

Modelo 2:

En caso de que los fenómenos de transporte interno resulten limitantes para la velocidad del proceso global, puede esperarse un comportamiento directamente proporcional a la concentración de las especies. En el sistema objeto de este estudio hay que referirse al ácido benzoico, dado que el glicerol se encuentra en un gran exceso, como ya se ha indicado.

El parámetro dependiente de la temperatura cambia en función de la expresión de Arrhenius (Ecuación 3.4), la cual constituye uno de los criterios físicos para la discriminación de modelos cinéticos: las constantes cinéticas deben seguir la tendencia con la temperatura que marca dicha ecuación.

Tabla 4.10. Modelos cinéticos propuestos para la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina catalizada por Novozym® 435

Modelo	Ecuaciones Cinéticas		Parámetros dependientes de T (*)
1	$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$	[4.2]	k
2	$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = k \cdot C_E \cdot C_B$	[4.4]	k

Para el cálculo de los parámetros se ha aplicado el método integral, tal como se explica en el apartado 2.4, realizado los ajustes por mínimos cuadrados de los Modelos 1 y 2 a los datos experimentales, comprobando, en primer lugar, que se cumplen los criterios físicos y estadísticos, experimento a experimento, para finalmente realizar el ajuste lineal múltiple considerando todos los datos experimentales. Las Figuras 4.17 y 4.18, muestran el análisis de residuos de los ajustes de los modelos cinéticos propuestos en función del avance de la reacción. El ajuste en ambos casos es bueno, aunque a tiempos bajos existe algo más de dispersión, sobre todo en condiciones de concentración de ácido benzoico más elevadas. En cualquier caso, al tratarse de un error porcentual, la predicción del modelo es aceptable si se analizan las discrepancias en valores absolutos.

La Tabla 4.8 recoge los valores de las constantes cinéticas así calculados, además de los parámetros estadísticos. Se puede observar que se puede conseguir un ajuste razonable con ambos modelos, y que no se pueden detectar diferencias significativas entre ellos. Tanto la energía de activación, como el factor pre-exponencial presentan intervalos de confianza muy estrechos. El error es algo menor para el caso del Modelo 1, y estadísticamente también se puede considerar que este modelo reproduce mejor los datos experimentales ya que la

SQR es inferior, mientras que la F_{95} es mayor y el criterio de información de Akaike corregido es menor. La representación gráfica del mejor ajuste (Modelo 1) se muestra en las Figuras 4.19, 4.20 y 4.21.

La proximidad de los resultados de ajuste obtenidos para el modelo hiperbólico (Michaelis-Menten) y de orden 1, da fundamento a la idea de la importancia que están teniendo en el sistema los fenómenos de transporte de materia, tal como se ha observado en los experimentos previos de este capítulo. El siguiente apartado se centra en el estudio de estos fenómenos.

Tabla 4.11. Valor de los parámetros e intervalos de confianza calculados para los modelos cinéticos de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina catalizada por Novozym®435.

Modelo	Parámetro	Valor \pm error	SQR	F_{95}	AICc
1	E_{ak} (J/mol)	$1,43 \cdot 10^4 \pm 1,39 \cdot 10^3$	$2,25 \cdot 10^{-2}$	$7,74 \cdot 10^3$	$-1,0 \cdot 10^3$
	\ln_{k0}	$-2,08 \pm 0,50$			
	K (M)	$4,58 \cdot 10^{-1} \pm 9 \cdot 10^{-3}$			
2	E_{ak} (J/mol)	$1,32 \cdot 10^4 \pm 1,87 \cdot 10^3$	$3,19 \cdot 10^{-2}$	$5,35 \cdot 10^3$	$-9,7 \cdot 10^2$
	\ln_{k0}	$-2,12 \pm 0,67$			

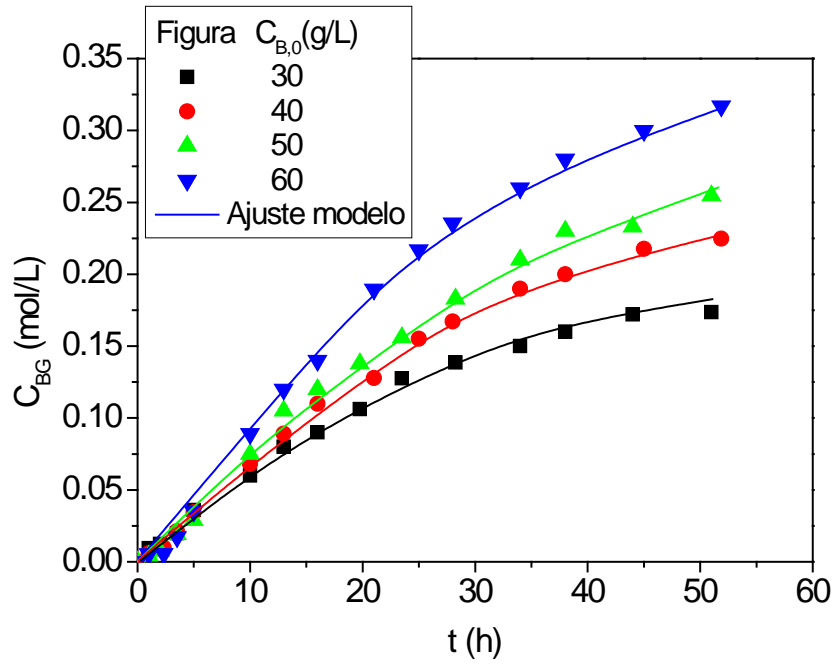


Figura 4.19. Resultados del ajuste del Modelo 1 para $T=50^{\circ}\text{C}$

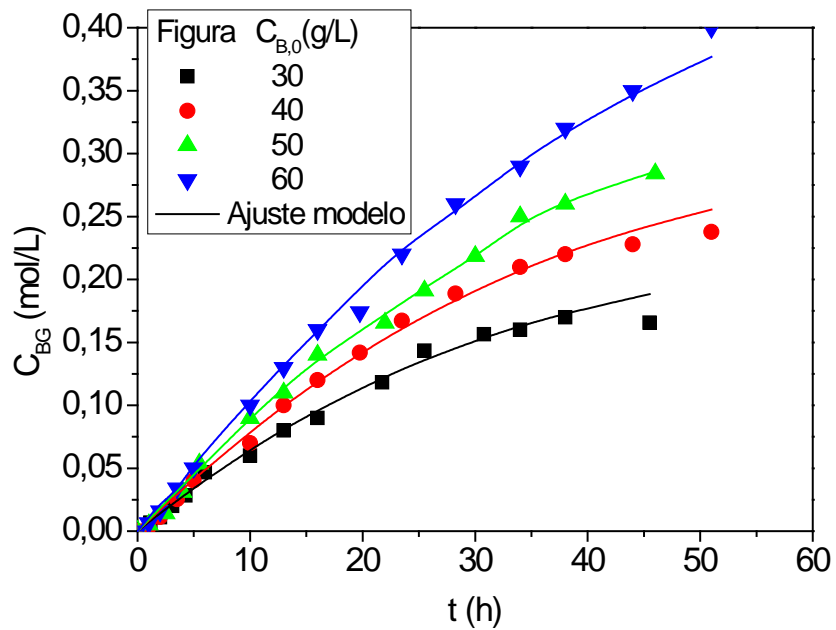


Figura 4.20. Resultados del ajuste del Modelo 1 para $T=60^{\circ}\text{C}$

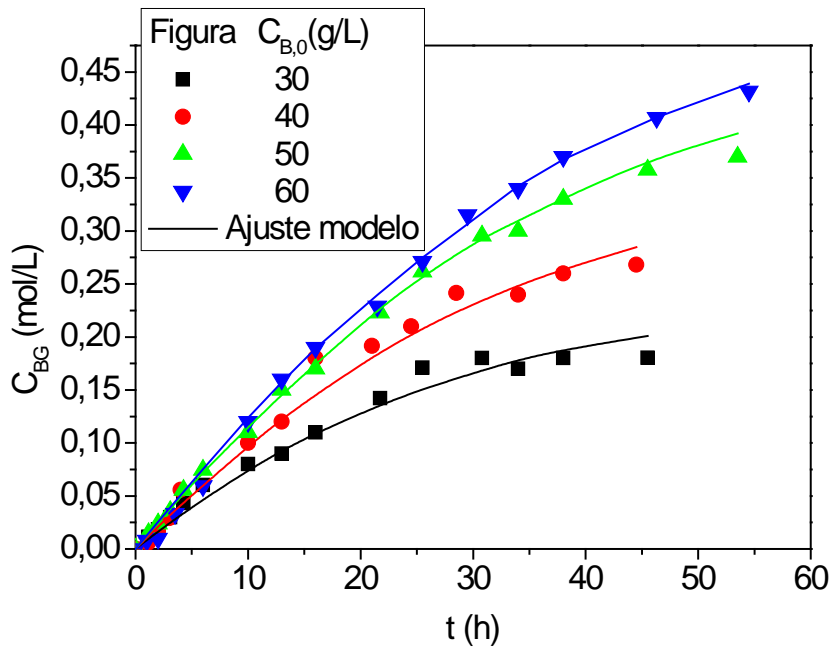


Figura 4.21. Resultados del ajuste del Modelo 1 para T=70°C

4.4. ESTUDIO DE LOS FENÓMENOS DE TRANSPORTE

Una vez se ha observado, tanto experimentalmente como a partir del estudio cinético, la importancia de los fenómenos de transferencia de materia en la esterificación de glicerina y ácido benzoico catalizada por Novozym®435, en este apartado se plantea una comprobación estimativa.

Para ello se han aplicado, en primer lugar, algunos criterios descritos en la literatura que, utilizando variables experimentales, es decir, medibles, y otras estimadas permiten evaluar el grado de importancia que pueden tener los fenómenos de transporte en un sistema concreto (Fogler, 1992). Se fundamentan en comparar las velocidades de los tres procesos en serie que tienen lugar en cualquier sistema de reacción con catalizadores heterogéneos:

Transferencia de materia desde el seno del medio hasta la superficie de la partícula de catalizador (transporte externo).

Transferencia de materia desde la superficie del catalizador a través de los poros del catalizador heterogéneo hasta el punto en el interior del poro donde tiene lugar la reacción química (transporte interno).

Una vez aplicados los criterios y comprobada la existencia de limitaciones al transporte se ha realizado un estudio más profundo de la cinética del sistema en condiciones de limitaciones al transporte interno.

Estimación de Propiedades

Para poder aplicar estos criterios, es necesario estimar propiedades y coeficientes de transporte y propiedades termodinámicas, tales como el coeficiente de transferencia de materia $k_{L,i}$, la difusividad molecular D_{ij} o el volumen molar, V_i . Para ello se han utilizado una serie de correlaciones recogidas en la literatura y que se muestran a continuación:

- *Correlación de Frössling* para la determinación de $k_{L,i}$ (Fogler, 1992):

$$Sh = 2 + 0,6 * Re^{1/2} * Sc^{1/3} \quad [4.5]$$

siendo:

$$Re = \frac{U * \rho * d_p}{\mu} \quad [4.6]$$

$$Sh = \frac{k_{L,i} * d_p}{D_{ij}} \quad [4.7]$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho * D_{ij}} \quad [4.8]$$

- *Ecuación de Wilke y Chang* para el cálculo de la difusividad molecular, D_{ij} (Wilke y col., 1955):

$$D_{ij}^{\circ} = \frac{7,4 \cdot 10^{-8} * (\phi * M_j)^{0,5} * T}{\mu_j * V_i^{0,6}} \quad [4.9]$$

donde D_{ij}° (cm²/s) corresponde a la difusividad molecular de i en el disolvente j, M_j (g/mol) es el peso molecular del disolvente, T la temperatura (K), μ_j es la viscosidad del disolvente (cP), V_i es el volumen molar a la temperatura de ebullición normal del soluto (cm³/mol) y ϕ es un factor de asociación del disolvente (adimensional). Este parámetro es empírico y su valor se ha determinado igual a 2,6 para agua; 1,9 para metanol; 1,5 para etanol y 1 para disolventes sin asociación molecular. Teniendo también en cuenta las fuertes interacciones moleculares de la glicerina, en este trabajo se ha considerado un valor de $\phi = 1,9$.

- Para la determinación de la difusividad molecular, se ha aplicado también la *ecuación de Scheibel*:

$$D_{ij}^{\circ} = \frac{K * T}{\mu_j * V_i^{1/3}} \quad [4.10]$$

con el siguiente valor del parámetro K:

$$K = 8,2 \cdot 10^{-8} * \left[1 + \left(\frac{3 * V_j}{V_i} \right)^{2/3} \right] \quad [4.11]$$

- *Método de Tyn y Calus* para determinar el volumen molar a temperatura de ebullición normal, V_i (Perry y col., 2008):

$$V_i = 0,285 * V_{C,i}^{1,048} \quad [4.12]$$

siendo $V_{C,i}$ el volumen molar crítico del soluto i (cm³/mol).

Finalmente, el coeficiente de difusión efectivo, D_e , se ha estimado según:

$$D_e = \frac{D_{ij} * \varepsilon_p * \sigma_c}{\tau} \quad [4.13]$$

donde D_{ij} es la difusividad molecular; ε_p es la porosidad total de la partícula; σ_c es el factor de constricción del poro que relaciona el tamaño de la molécula que se difunde y el tamaño del poro; y τ , que es un parámetro geométrico: la tortuosidad. Estos parámetros son empíricos, aunque existen trabajos que proponen vías para poder estimarlos.

Utilizando los datos bibliográficos y las Ecuaciones [4.5] a [4.13], se han determinado las propiedades necesarias para llevar a cabo el estudio de la transferencia de materia, en el intervalo de temperaturas de trabajo. Estos resultados se recogen en la Tabla 4.9. Aunque se ha estimado la difusividad molecular del ácido benzoico en glicerina por dos vías, los resultados son prácticamente idénticos, de manera que se presentan en una única columna.

Tabla 4.12. Valores de las propiedades y parámetros estimados para diferentes condiciones de operación.

T (°C)	100% glicerina		
	μ_G (cP)	$D_{B,G}^0$ (m ² /s)	$k_{L,B}$ (m/s)
40	282,44	$7,07 \cdot 10^{-12}$	$2,36 \cdot 10^{-8}$
50	146,46	$1,41 \cdot 10^{-11}$	$4,69 \cdot 10^{-8}$
60	82,23	$2,58 \cdot 10^{-11}$	$8,62 \cdot 10^{-8}$
70	49,42	$4,43 \cdot 10^{-11}$	$1,48 \cdot 10^{-7}$
80	31,50	$7,15 \cdot 10^{-11}$	$2,38 \cdot 10^{-7}$

4.4.1. Transporte Externo

Para la realización de estas comprobaciones se han elegido las dos condiciones que pueden considerarse extremas en el intervalo de trabajo. Por una lado, una temperatura baja, que implica una viscosidad muy elevada del medio y, por lo tanto, mayores dificultades para la difusión. Por otro lado, temperaturas elevadas, donde la velocidad de la etapa química es mayor y su resistencia menor frente a la del transporte de materia, sea éste externo o interno. Los valores determinados experimentalmente para estas condiciones, aplicando el método de las velocidades iniciales, son los que se presentan en la Tabla 4.10.

Tabla 4.13. Velocidades observadas en los extremos del intervalo de temperaturas

T (°C)	C _{B,0} (g/L)	r ₀ (mol/L·h)
50	30	6,6·10 ⁻³
70	30	9,6·10 ⁻³

Se ha aplicado el “Criterio de Mears” (Mears, 1971), que relaciona la velocidad real observada de desaparición del reactivo/soluto i con su velocidad de difusión, de acuerdo a:

$$C_M = \frac{-r_{i,obs} * R_P * n}{k_{L,i} * C_{i,0}} \quad [4.14]$$

donde r_{i,obs} es la velocidad de desaparición de reactivo i (mol/L·s), R_P es el radio de partícula (cm), n es el orden de reacción, k_{L,i} es el coeficiente de transferencia de materia (cm/s) y C_{i,0} es la concentración inicial de reactivo i (mol/L).

Si C_M < 0,15, entonces se puede considerar que la velocidad de la transferencia de materia en la película externa es más rápida que la reacción química y, por tanto, no influye en la velocidad del proceso global de esterificación.

Aplicando este criterio a las dos concentraciones extremas del intervalo de trabajo, se obtienen los valores de la Tabla 4.11. Se observa que para el transporte externo, incluso en las condiciones menos favorables, esto es a mayores viscosidades, cuando menor es la temperatura, se satisface el criterio de Mears, ya que se cumple, en todo momento, que C_M<0,15.

Tabla 4.14. Valores calculados para aplicar el criterio de Mears para condiciones extremas del intervalo de trabajo

T (°C)	C _{B,0} (g/L)	C _M
50	30	0,05
70	30	0,02

4.4.2. Transporte Interno

Para comprobar la existencia de limitaciones al transporte interno, se ha aplicado el “Criterio de Weisz y Prater” para la difusión interna (Weisz y col., 1962). Este criterio relaciona la velocidad real observada de desaparición del reactivo/soluto con su velocidad de difusión a través de los poros del catalizador sólido, según:

$$C_{WP} = \frac{-r_{i,obs} * \rho_{cat} * R_p^2}{D_e * C_{i,S}} \quad [4.15]$$

donde $r_{i,obs}$ es la velocidad de desaparición de reactivo i (mol/L·s), ρ_{cat} es la densidad del catalizador, R_p es el radio de partícula, D_e es el coeficiente de difusión efectivo y $C_{i,S}$ es la concentración de sustrato en la superficie de la partícula del catalizador, es decir, en la boca de los poros.

Si $C_{WP} > 1$, se descarta la existencia de limitaciones al transporte interno.

Para este cálculo en concreto, se puede sustituir en la Ecuación [4.15] el coeficiente de difusión efectivo, D_e , por la difusividad molecular, D_{ij} , estimada en el apartado 4.4.1, asumiendo que esta aproximación es, en cualquier caso conservadora (de acuerdo a la Ecuación [4.13] D_e será bastante inferior).

Al aplicar así el criterio de Weisz-Prater se comprueba la existencia de una fuerte resistencia al transporte interno, ya que en las condiciones reales de operación. donde $D_e < D_{ij}$, las limitaciones al transporte interno serán aún mayores..

Como se ha comprobado que no existen limitaciones al transporte externo, se ha considerado que la concentración de ácido en la boca del poro será la misma que en el seno del fluido, aproximadamente la concentración inicial de ácido benzoico si se aplica el método de velocidades iniciales para determinar la velocidad de reacción. En función de lo descrito hasta este punto, la Ecuación [4.15], se traduce en una expresión como la siguiente:

$$C_{WP} = \frac{-r_{i,obs} \cdot 0,43 \frac{g^{N435}}{cm^3} \cdot (0,35cm)^2}{30 \frac{g^{N435}}{L} \cdot D_{i,j} \cdot C_{B,0}} \quad [4.16]$$

Aplicando el criterio de Weisz-Prater (Ecuación [4.16]), se pueden determinar valores del coeficiente C_{WP} , que son siempre inferiores a la unidad, de manera que se confirma, una vez más, que el control del proceso de producción de monoglicérido de ácido benzoico será, cuando menos, mixto entre la etapa química y la de transporte interno de materia. A diferencia de lo observado al estudiar las limitaciones en el transporte externo, la velocidad de la reacción química se verá más afectada por un incremento de temperatura, que la difusión en los poros. La relación de la primera respecto a la segunda se hace cada vez mayor, de modo que a medida que aumente T las limitaciones al transporte interno de materia se hacen más significativas.

Aunque estos cálculos son aproximado, se confirma que la etapa de transporte externo es muy rápida comparada con la reacción enzimática y, por el contrario, la etapa de difusión en los poros es bastante más lenta y está controlando o al menos influyendo en la velocidad global del proceso. Más adelante se hace un estudio más profundo y riguroso de estos aspectos.

Tabla 4.15. Valores para aplicar el criterio de Weisz-Prater para las condiciones extremas del intervalo de trabajo.

T (°C)	$C_{B,0}$ (g/L)	C_{WP}
50	30	0,93
70	30	0,43

Con estos antecedentes, se ha planteado un estudio de la cinética del proceso de síntesis de ácido benzoico y glicerina pura, catalizada por Novozym® 435 enzima inmovilizada que provoca que haya una importante resistencia al transporte en los poros.

Considerando una partícula esférica de radio R_p , se ha planteado un balance de materia en el espacio infinitesimal comprendido entre un radio cualquiera, r y $r+\Delta r$, para un compuesto i , como se esquematiza en la Figura 4.22.

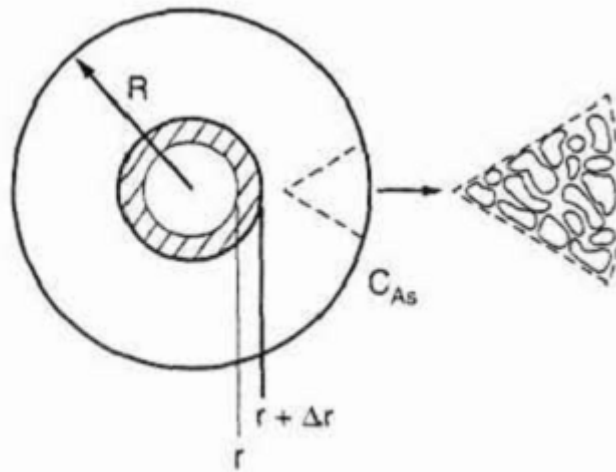


Figura 4.22. Esquema de partícula de catalizador y elemento diferencial de volumen sobre el que se aplica el balance de materia.

$$[Salida_i] = [Entrada_i] + [Generado_i] \quad [4.17]$$

El flujo de materia, en el caso a considerar, va al contrario de la dirección radial. De forma particular, para el sistema aquí descrito, los caudales de materia transportados se pueden expresar como:

$$[Caudal_i] = j_i \cdot S \quad [4.18]$$

Operando con la Ecuación [4.17] y aplicando la Ecuación [4.18] se obtiene:

$$(j_i \cdot S)_r - (j_i \cdot S)_{r+\Delta r} = R_i \cdot \Delta V \quad [4.19]$$

$$j_i(4\pi r^2)_r - j_i(4\pi r^2)_{r+\Delta r} = R_i \cdot (4\pi r^2 \cdot \Delta r) \quad [4.20]$$

Dividiendo la ecuación 4.20 por $(4 \cdot \pi \cdot \Delta r)$ y aplicando límites para $\Delta r \rightarrow 0$, se obtiene:

$$\frac{d(j_i \cdot r^2)}{dr} = R_i \cdot r^2 \quad [4.21]$$

Sustituyendo teniendo en cuenta la Ecuación [4.3], resulta:

$$\frac{d\left[\left(-D_e \cdot \frac{dC_i}{dr}\right) \cdot r^2\right]}{dr} = R_i \cdot r^2 \quad [4.22]$$

Reorganizando y particularizando las ecuaciones para un modelo cinético tipo Michaelis-Menten, se obtiene una expresión (Ecuación [4.23]), que no tiene solución analítica:

$$\frac{1}{r^2} \cdot \frac{d\left[\left(-D_e \cdot \frac{dC_i}{dr}\right) \cdot r^2\right]}{dr} = R_i = \frac{v_{\max} \cdot C_i}{K_M + C_i} \quad [4.19]$$

Por otro lado, conocido el concepto de factor de efectividad, η , como se ha explicado en los experimentos previos (Ecuación [4.1]), si se define el "Módulo de Thiele", como:

$$\phi = \frac{r_{i,S}}{\text{velocidad difusión}} \quad [4.24]$$

La resolución numérica de la Ecuación [4.23] conduce a curvas intermedias de tipo $\eta = f(\phi)$, entre las correspondientes a orden 1 y orden 0 (con solución analítica) (Velasco, 1999). De este modo, conociendo las condiciones específicas de transporte del proceso en las condiciones de operación empleadas, se puede determinar el factor de efectividad. En particular, para un modelo cinético tipo Michaelis-Menten, el Módulo de Thiele viene definido como:

$$\phi = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \frac{V_p}{S_p} \sqrt{\frac{v_{\max}}{D_e \cdot C_{i,S}}} \left(\frac{1}{1+\beta}\right) \left[1 + \beta \cdot \ln\left(\frac{\beta}{1+\beta}\right)\right]^{-0,5} \quad [4.205]$$

$$\text{siendo: } \beta = \frac{K_M}{C_{i,S}} \quad [4.216]$$

Se han aplicado las Ecuaciones [4.25] y [4.26] y el método gráfico para la determinación del coeficiente de difusión efectivo del ácido benzoico en glicerina pura dentro de la partícula del catalizador. Para ello, han sido necesarios los datos experimentales de producción de BG con CALBL y con Novozym®435 en las distintas condiciones de operación. Los factores de efectividad calculados resultan tener un valor de alrededor de 0,5, como se anticipó al comentar los experimentos previos. De igual forma, se comprueba que un incremento en la temperatura provoca que el factor de efectividad disminuya, lo que plantea un impedimento importante para el sistema, considerando que son precisamente éstas las condiciones más favorables para la cinética de la propia reacción química. Los valores del coeficiente de difusión efectivo resultan dos órdenes de magnitud inferiores a los de la difusividad molecular estimados. De aquí que las limitaciones al transporte sean tan importantes en el proceso.

Al operar en condiciones sin disolvente con la enzima inmovilizada, Novozym® 435, se provoca que el catalizador se esté infrutilizando para la producción del monoéster de ácido benzoico y glicerina, debido a la baja velocidad del transporte en los poros.

Tabla 4.16. Determinación de D_e , a partir de los resultados experimentales.

T (°C)	$C_{B,0}$ (g/L)	r_{obs} N435 (mol/L·h)	r_{obs} CALBL (mol/L·h)	η	ϕ	K (M·L/h·mgE)	D_e (cm ² /s)
50	30	$6,6 \cdot 10^{-3}$	$1,14 \cdot 10^{-2}$	0,6	1,2	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$4,01 \cdot 10^{-9}$
	40	$6,8 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \cdot 10^{-2}$	0,5	1,5		$2,22 \cdot 10^{-9}$
	60	$6,7 \cdot 10^{-3}$	$1,42 \cdot 10^{-2}$	0,5	1,5		$1,73 \cdot 10^{-9}$
60	30	$6,7 \cdot 10^{-3}$	$1,82 \cdot 10^{-2}$	0,4	2	$1,54 \cdot 10^{-5}$	$2,09 \cdot 10^{-9}$
	40	$8,3 \cdot 10^{-3}$	$1,67 \cdot 10^{-2}$	0,5	1,5		$3,21 \cdot 10^{-9}$
	60	$9,6 \cdot 10^{-3}$	$1,76 \cdot 10^{-2}$	0,5	1,2		$3,92 \cdot 10^{-9}$
70	30	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,99 \cdot 10^{-2}$	0,3	3	$2,18 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-9}$
	40	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,53 \cdot 10^{-2}$	0,4	1,5		$4,55 \cdot 10^{-9}$
	60	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,24 \cdot 10^{-2}$	0,5	1,5		$3,5 \cdot 10^{-9}$

Utilizando los valores del coeficiente de difusión efectivo obtenidos, se puede determinar la relación de los parámetros empíricos del factor de constricción de poro y tortuosidad, σ_c/τ , que son característicos de la partícula de catalizador y que proporcionan información sobre cómo tiene lugar la difusión en el interior del soporte sólido del preparado Novozym®435. Como se puede observar en la Tabla 4.14, esta relación es bastante pequeña, un orden de magnitud inferior a lo que suele considerarse como valores típicos en la bibliografía ($\sigma_c/\tau \approx 0,8/3$). Este fenómeno se debe a las propias características de inmovilización física de la enzima en forma de corona alrededor de la partícula soporte que, además, tiende a formar agregados, aumentando la tortuosidad de los poros y lo que refleja este parámetro: la complejidad interna de la estructura porosa.

Tabla 4.17. Determinación empírica de la relación factor de constricción del poro, σ_c , y tortuosidad, τ , en la partícula de Novozym®435.

T (°C)	$D_{e,media}$ (cm ² /s)	σ_c/τ
50	$2,7 \cdot 10^{-9} \pm 1,2 \cdot 10^{-9}$	$4,4 \cdot 10^{-2}$
60	$3,1 \cdot 10^{-9} \pm 9,2 \cdot 10^{-10}$	$2,8 \cdot 10^{-2}$
70	$3,1 \cdot 10^{-9} \pm 1,7 \cdot 10^{-9}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Addorisio, V.; F. Sannino; C. Mateo y J. M. Guisan (2013). "Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from *Trametes versicolor*." *Process Biochemistry* **48**(8): 1174-1180.
- Ansari, S. A. y Q. Husain (2012). "Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review." *Biotechnology Advances* **30**(3): 512-523.
- Bernal, C.; M. Marciello; M. Mesa; L. Sierra; G. Fernandez-Lorente; C. Mateo y J. M. Guisan (2013). "Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support." *International Dairy Journal* **28**(2): 76-82.
- Bhattacharya, S.; A. Drews; E. Lyagin; M. Kraume y M. B. Ansorge-Schumacher (2012). "Efficient Chemo-Enzymatic Epoxidation Using silcoat-Novozym®435: Characterizing the Multiphase System." *Chemical Engineering & Technology* **35**(8): 1448-1455.
- Chen, B.; M. E. Miller y R. A. Gross (2007). "Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity." *Langmuir* **23**(11): 6467-6474.
- Findrik, Z.; G. Németh; Đ. Vasić-Rački; K. Bélafi-Bakó; Z. Csanádi y L. Gubicza (2012). "Pervaporation-aided enzymatic esterifications in non-conventional media." *Process Biochemistry* **47**(12): 1715-1722.
- Fogler, H. S. (1992). "Elements of chemical reaction engineering", Prentice-Hall.
- Frampton, M. B.; J. P. Séguin; D. Marquardt; T. A. Harroun y P. M. Zelisko (2013). "Synthesis of polyesters containing disiloxane subunits: Structural characterization, kinetics, and an examination of the thermal tolerance of Novozym-435." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85–86**(0): 149-155.
- Garcia-Ochoa, F.; A. Romero y J. Querol (1990). "n-Octane liquid-phase oxidation catalyzed by cobalt salts: Overall kinetic and product distribution." *The Chemical Engineering Journal* **43**(1): 33-40.
- Gog, A.; M. Roman; M. Toşa; C. Paizs y F. D. Irimie (2012). "Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives." *Renewable Energy* **39**(1): 10-16.
- Gryglewicz, S.; E. Jadownicka y A. Czerniak (2000). "Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium." *Biotechnology Letters* **22**(17): 1379-1382.
- Guyot, B.; B. Bosquette; M. Pina y J. Graille (1997). "Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium." *Biotechnology Letters* **19**(6): 529-532.
- Hossain, M. M.; D. D. Do y J. E. Bailey (1986). "Immobilization of enzymes in porous solids under restricted diffusion conditions." *AIChE Journal* **32**(7): 1088-1098.
- Huang, B.; C. H. Bartholomew y B. F. Woodfield (2014). "Improved calculations of pore size distribution for relatively large, irregular slit-shaped mesopore structure." *Microporous and Mesoporous Materials* **184**(1): 112-121.

- Itabaiana Jr, I.; L. S. de Mariz e Miranda y R. O. M. A. de Souza (2013). "Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85–86**(1): 1-9.
- José, C.; G. B. Austic; R. D. Bonetto; R. M. Burton y L. E. Briand (2013). "Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel." *Catalysis Today* **213**(1): 73-80.
- Jun, C.; B. W. Jeon; J. C. Joo; Q. A. T. Le; S.-A. Gu; S. Byun; D. H. Cho; D. Kim; B.-I. Sang y Y. H. Kim (2013). "Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification." *Process Biochemistry* **48**(8): 1181-1187.
- Kumar, A. y R. A. Gross (2000). "Candida antarctica Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters." *Journal of the American Chemical Society* **122**(48): 11767-11770.
- Ladero, M.; M. de Gracia; J. J. Tamayo; I. L. d. Ahumada; F. Trujillo y F. Garcia-Ochoa (2011). "Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: Application to industrial operation." *Chemical Engineering Journal* **169**(1–3): 319-328.
- Ladero, M.; G. Ruiz; B. C. C. Pessela; A. Vian; A. Santos y F. Garcia-Ochoa (2006). "Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme." *Biochemical Engineering Journal* **31**(1): 14-24.
- Ladero, M.; A. Santos y F. García-Ochoa (2001). "Diffusion and chemical reaction rates with nonuniform enzyme distribution: An experimental approach." *Biotechnology and Bioengineering* **72**(4): 458-467.
- Ochoa (2001). "Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: kinetic modelling." *Enzyme and Microbial Technology* **29**(2–3): 181-193.
- Le Joubioux, F.; N. Bridiau; Y. Ben Henda; O. Achour; M. Graber y T. Maugard (2013). "The control of Novozym® 435 chemoselectivity and specificity by the solvents in acylation reactions of amino-alcohols." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **95**(1): 99-110.
- Lozano, P.; J. M. Bernal y A. Navarro (2012). "A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases." *Green Chemistry* **14**(11): 3026-3033.
- ; D. Gómez; A. B. Gayo; J. A. Sánchez-Conesa; M. Rubio y J. L. Iborra (2004). "Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide." *The Journal of Supercritical Fluids* **29**(1–2): 121-128.
- Martins, A. B.; M. F. Schein; J. L. R. Friedrich; R. Fernandez-Lafuente; M. A. Z. Ayub y R. C. Rodrigues (2013). "Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability." *Ultrasonics Sonochemistry* **20**(5): 1155-1160.
- Mateo, C.; O. Abian; R. Fernandez-Lafuente y J. M. Guisan (2000). "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support–polyethylenimine composites." *Biotechnology and Bioengineering* **68**(1): 98-105.

- Mears, D. E. (1971). "Tests for Transport Limitations in Experimental Catalytic Reactors." *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **10**(4): 541-547.
- Mei, Y.; L. Miller; W. Gao y R. A. Gross (2002). "Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy." *Biomacromolecules* **4**(1): 70-74.
- Perry, R. H. y D. W. Green (2008). "Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth Edition", McGraw-Hill Professional Publishing.
- Poppe, J. K.; A. P. O. Costa; M. C. Brasil; R. C. Rodrigues y M. A. Z. Ayub (2013). "Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **94**(1): 57-62.
- Poulhès, F.; D. Mouysset; G. Gil; M. P. Bertrand y S. Gastaldi (2012). "Novozym 435-catalyzed synthesis of polyetheramides from amino-esters, or diesters and diamines built on ethylene- and diethylene- glycol moieties." *Polymer* **53**(6): 1172-1179.
- Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance." *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**(8-9): 1289-1307.
- Shuklov, I. A.; N. V. Dubrovina; J. Schulze; W. Tietz; K. Kühlein y A. Börner (2012). "Ruthenium- and lipase-catalyzed inversion of l-lactates." *Tetrahedron Letters* **53**(47): 6326-6328.
- V. Sinisterra (2000). "Enzymatic Amidation and Alkoxy-carboxylation of Amines using Native and Immobilised Lipases with Different Origins: a Comparative Study." *Tetrahedron* **56**(10): 1387-1391.
- Stevenson, D. E.; S. G. Parkar; J. Zhang; R. A. Stanley; D. J. Jensen y J. M. Cooney (2007). "Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®)." *Enzyme and Microbial Technology* **40**(5): 1078-1086.
- Toledo, M. V.; C. José; S. E. Collins; R. D. Bonetto; M. L. Ferreira y L. E. Briand (2012). "Esterification of R/S-ketoprofen with 2-propanol as reactant and solvent catalyzed by Novozym® 435 at selected conditions." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **83**(1): 108-119.
- Tufvesson, P.; A. Annerling; R. Hatti-Kaul y D. Adlercreutz (2007). "Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides." *Biotechnology and Bioengineering* **97**(3): 447-453.
- Velasco, J. R. G. (1999). "Cinética química aplicada", Editorial Síntesis, S.A.
- Weisz, P. B. y J. S. Hicks (1962). "The behaviour of porous catalyst particles in view of internal mass and heat diffusion effects." *Chemical Engineering Science* **17**(4): 265-275.
- Wilke, C. R. y P. Chang (1955). "Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions." *AIChE Journal* **1**(2): 264-270.
- Yadav, G. D. y P. S. Lathi (2004). "Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols." *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **223**(1-2): 51-56.

Yang, Z. y W. Pan (2005). "Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis." *Enzyme and Microbial Technology* **37**(1): 19-28.

Zhao, H. y G. A. Baker (2013). "Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **88**(1): 3-12.

**5.- Esterificación de Glicerina y
Ácido Benzoico con
Novozym®435 con Adición de
Agua**

5. ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA Y ÁCIDO BENZOICO CON NOVOZYM® 435 CON ADICIÓN DE AGUA

En el Capítulo 4 se ha estudiado la esterificación de ácido benzoico con glicerina catalizada por el preparado inmovilizado comercial de la lipasa B de *Candida antarctica*, Novozym® 435. Se ha observado que los fenómenos de transporte interno tienen una importancia a considerar, ya que las limitaciones a la difusión en el interior de los poros de la partícula del biocatalizador determinan la cinética del sistema hasta el punto que el rendimiento se reduce hasta un 30% respecto de lo observado en condiciones de ausencia de limitaciones al transporte de materia, esto es, al trabajar con la enzima libre (Capítulo 3). Muchos inmovilizados industriales se obtienen por inmovilización de grandes cantidades de proteína, lo más pura posible siempre que se cumplan unos requisitos económicos y técnicos. La lipasa B de *Candida antarctica* se ha inmovilizado por interacción hidrofóbica en varias resinas, resultando siempre que se pueden obtener concentraciones de enzima elevadas y perfiles enzimático de tipo exponencial, con la enzima preferentemente localizada en la parte externa, cerca de la superficie (Chen y col., 2007). Esta distribución en “cáscara de huevo” es interesante para asegurar un mayor control de la reacción bioquímica cuando la carga de enzima es baja (Ladero y col., 2001; Cruz y col., 2012). El exceso de enzima puede conducir, como se observó en el capítulo anterior, al bloqueo de poros y a la acumulación de enzima en ciertas partes de la estructura porosa. Varios trabajos muestran la importancia de la adecuación de la estructura porosa a cada tipo de enzima (o proteína) para obtener la máxima carga y estabilidad (Takahashi y col., 2000; Serra y col., 2008). El uso de aditivos durante la inmovilización en soporte poroso permite obtener un perfil algo más homogéneo: por ejemplo, el uso de etanol en la inmovilización hidrofóbica de la lipasas CALB llevó a conseguir cargas tan elevadas como 200-400 mg/g, de un 20 a un 40% en peso de la lipasa en el soporte (Blanco y col., 2007).

En condiciones de elevada concentración local de catalizador, en este caso, de enzima, y dada la elevada viscosidad de los medios líquidos frente a los gaseosos, no es de extrañar que muchos procesos enzimáticos transcurran en condiciones de control difusional o de control mixto entre la reacción química y la difusión en la estructura porosa. En el caso del preparado enzimático Novozym 435, la enzima está presente en concentraciones cercanas a 200 mg/g (20%). En el caso de la lipasa comercial Lipozyme TL IM, el proceso de granulación con sílice, celulosa y dextrina lleva a una estructura porosa con distribución más homogénea de la enzima y una concentración de la misma en torno al 6%. En el proceso de granulación se emplean líquidos en porcentajes reducidos (7-10%) y se secan en torre de lluvia. En ambos casos, como en tantos otros, tan alta concentración tiene por objeto asegurar la actividad de la enzima durante, al menos, 3 meses en condiciones apropiadas de almacenamiento y el mayor tiempo posible en condiciones de uso (Ren y col., 2011). Para obtener estas enzimas en gran cantidad de forma económica, los genes originales se han clonado en *Aspergillus niger* (Høegh y col., 1995; Sharma y col., 2001; Prathumpai y col., 2004). La estabilización de los preparados enzimáticos por aglomeración ha llevado a desarrollar técnicas basadas en formación de cristales o de glomérulos y entrecruzamiento posterior, evitando el uso de soportes porosos. Un ejemplo son las lipasas TL IM y RM IM de Novozymes, obtenidas por granulación y entrecruzamiento. Otros ejemplos son los desarrollos del grupo del profesor Roger Sheldon, de la Universidad Técnica de Delft: la creación de CLEAs y CLECs (“cross-linked enzyme aggregates” y “cross-linked enzyme crystals”, respectivamente). En estos casos, la concentración de enzimas alcanza su máximo y la estabilización con polímeros y por las propias enzimas es extraordinaria, reduciéndose mucho el coste en el caso de los CLEAs (no hay que purificar la enzima a homogeneidad para obtener los cristales previamente al entrecruzamiento) (Cao y col., 2003). Por otra parte, a veces es necesario modificar la estructura externa de las enzimas para facilitar el entrecruzamiento (Galvis y col., 2012).

Aunque operar en condiciones de control difusional o mixto es aconsejable desde la perspectiva de la estabilidad de la operación, ya que no se percibe el efecto de la desactivación en la conversión hasta que la actividad

enzimática global que queda en el preparado ha disminuido hasta el valor del factor de efectividad, la eficiencia catalítica es menor que la máxima disponible. Acelerar la transferencia de materia en los poros implica una mejora de dicha eficiencia y menos preparado enzimático inmovilizado para una determinada conversión. La aceleración de la difusión interna se puede lograr por varios medios: uso de campos eléctricos (Porrás-Parral y col., 2011; Reay y col., 2013), ultrasonidos (Hasan y col., 2013), cambios de presión (Thomas y col., 2002), uso de aditivos (Painmanakul y col., 2005; Lu y col., 2007), presencia de reacciones y fenómenos acoplados a la propia transferencia de materia (Ruthiya y col., 2003; Jeon y col., 2011; Biard y col., 2013) y empleo de soportes y reactores diseñados “ex profeso” (Taqvi y col., 1997; Schönfeld y col., 2004; Groen y col., 2006; Du y col., 2010). En el caso objeto de esta memoria, se ha podido comprobar que la presencia del monoéster y de agua, productos de la reacción objeto de este estudio, tiene un efecto positivo sobre la cinética del proceso. Este hecho se puede explicar por el carácter surfactante que tiene el éster, así como por la reducción de la viscosidad por la acumulación o adición de agua (Cheng, 2008). Estos fenómenos favorecen las condiciones del transporte de materia y, aunque en condiciones normales de trabajo no se producen de forma suficiente para contribuir significativamente a modificar el medio, plantean una posible vía para aumentar la eficiencia catalítica. Además, la adición de agua al medio también tiene efectos positivos sobre la estabilidad de la enzima (Kobayashi y col., 2008).

En este capítulo se profundiza en la utilización de la enzima inmovilizada, Novozym® 435, como catalizador para la esterificación de glicerina y ácido benzoico en un medio cuyos disolventes son glicerina y agua. Se han llevado a cabo algunos experimentos previos para conocer el efecto del agua sobre la solubilidad del ácido benzoico, sobre la viscosidad del medio y sobre la velocidad de transferencia de materia, así como para determinar las condiciones más adecuadas de temperatura y concentración de ácido benzoico para llevar a cabo el proceso. El estudio cinético posterior se llevó a cabo en las condiciones así determinadas, obteniéndose datos útiles para la selección de un modelo cinético que refleja la fenomenología de la síntesis de 1-monobenzoato de glicerol en condiciones de transferencia de materia mejorada por la presencia de agua.

5.1. EXPERIMENTOS PREVIOS

Se ha estudiado el efecto de las diferentes variables citadas anteriormente para acotar las condiciones de trabajo. En primer lugar, al modificar el medio en el que va a tener lugar la esterificación del ácido benzoico y la glicerina, es necesario evaluar algunas de las propiedades tanto del disolvente como del soluto:

- Solubilidad del ácido benzoico.
- Propiedades reológicas de las mezclas de glicerina y agua.
- Transporte de materia en mezclas glicerina y agua.
- Efecto de la temperatura y concentración de ácido benzoico.

5.1.1. Solubilidad de ácido benzoico en mezclas glicerina/ agua

La adición de agua a la glicerina modifica la polaridad de la mezcla resultante, ya que se trata de un compuesto muy polar. Este hecho tiene como consecuencia inmediata la variación en la capacidad del medio de disolver especies tales como el ácido benzoico, de carácter más bien lipófilo. En la Figura 5.1 se muestran varias curvas de solubilidad de ácido benzoico determinadas experimentalmente en medios con distinta concentración de agua. Como era de esperar, a medida que aumenta la concentración de agua en la mezcla, menor resulta la capacidad de ésta para disolver al ácido benzoico. El aumento de la temperatura favorece la solubilidad, tanto más significativamente cuanto menor es la concentración de agua. Este comportamiento tiene una tendencia de tipo exponencial, y se ha podido llevar a cabo el ajuste a los datos experimentales, obteniéndose la siguiente correlación:

$$C_B = n \cdot e^{\left(\frac{-T}{m}\right)}; \text{ con } [C_B] = \text{mol/L y } [T] = \text{°C} \quad [5.1]$$

Los valores de los parámetros se presentan en la Tabla 5.1, y el ajuste a los datos experimentales, en la Figura 5.1. Como se puede comprobar, los errores son pequeños y los coeficientes de correlación lo suficientemente

elevados para poder afirmar que las ecuaciones resultantes reproducirán correctamente la solubilidad del ácido benzoico en mezclas de glicerina y agua. Estas expresiones son útiles para simular condiciones de sobresaturación en el soluto, en las que existe el ácido benzoico no solo como especie disuelta sino también como sólido, como se verá más adelante en este Capítulo.

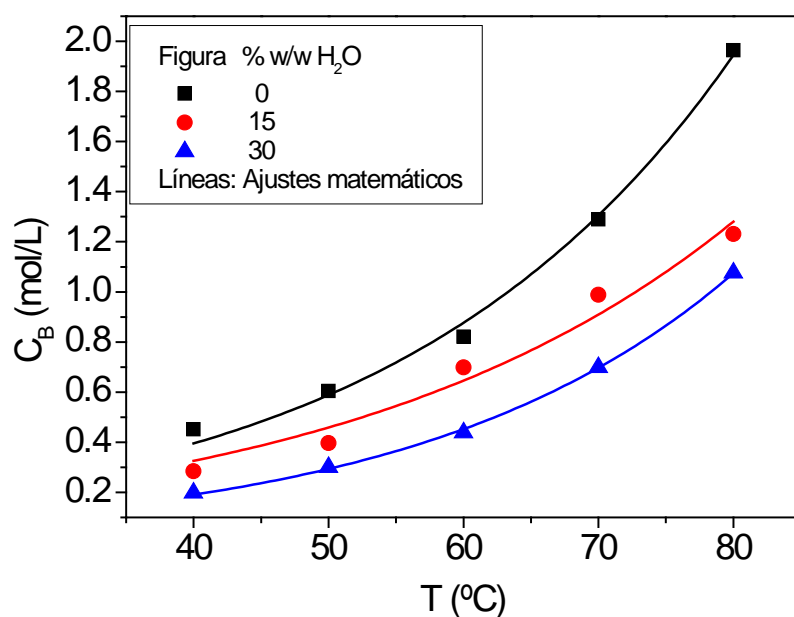


Figura 5.1. Solubilidad de ácido benzoico en diferentes mezclas glicerina/agua

Tabla 5.1. Ajuste exponencial a los datos experimentales de solubilidad de ácido benzoico en mezclas glicerina/agua

% w/w H ₂ O	N	M	R ²
0	0,080 ± 0,011	-25,1 ± 1,2	0,9936
15	0,083 ± 0,023	-29,2 ± 3,3	0,9638
30	0,034 ± 0,002	-23,1 ± 0,4	0,9992

5.1.2. Propiedades mezclas glicerina/ agua

El agua puede adicionarse en cualquier proporción al glicerol e interaccionará de forma importante con el polialcohol, debido a la posibilidad de formar enlaces tipo puentes de hidrógeno, formando mezclas homogéneas. Las propiedades de la disolución resultante se modifican como consecuencia de la mezcla, siendo especialmente notable el efecto sobre la viscosidad.

En la Figura 5.2 se recogen los resultados de la medida experimental de viscosidad de distintas mezclas glicerina/agua, así como los resultados de su estimación aplicando la correlación empírica de Cheng (Cheng, 2008). Por un lado, se puede comprobar la corrección de los valores estimados, que resultan muy cercanos a los medidos de forma experimental, una comprobación que tiene mucha utilidad en el momento de modelizar matemáticamente la evolución del sistema. Por otro lado, y al igual que se pudo comprobar en la solubilidad del ácido benzoico como efecto de la polaridad, la adición de agua al glicerol tiene un efecto muy significativo. Un incremento en el valor de la temperatura provoca una reducción en el valor de viscosidad de la mezcla, que a concentraciones bajas es muy agudo con una caída casi exponencial, y que se suaviza a medida que la proporción de agua en la mezcla, siendo la relación prácticamente lineal, hasta que a concentraciones de agua por encima del 30%, el efecto de la temperatura deja de ser significativo.

La relativa mayor importancia de la concentración de agua en la viscosidad de la mezcla queda de manifiesto más claramente en la Figura 5.3, donde también se aplica la correlación de Cheng. Se pueden distinguir dos zonas, una primera de descenso muy acusado hasta una proporción de agua de aproximadamente un 20%, y una segunda de pendiente más suave a partir de este punto. Este valor de concentración de agua es clave ya que es el punto de cambio de tendencia en todas las temperaturas dentro del intervalo de condiciones estudiadas. Es evidente que, al disminuir la viscosidad tan significativamente, la transferencia de materia, la difusión en los poros, será más rápida.

Teniendo en cuenta que se busca el escenario más propicio para llevar a cabo la esterificación de ácido benzoico y glicerina, es necesario encontrar una

solución de compromiso entre el efecto positivo que tiene para el transporte la adición de agua y el simultáneo perjuicio que esto puede ocasionar sobre la solubilidad del ácido en el medio de reacción. A priori, y teniendo en consideración el papel preponderante que tienen las limitaciones al transporte de materia sobre la velocidad del proceso, se ha elegido una concentración de 30% w/w de agua en la mezcla, que garantiza al sistema unas propiedades reológicas más favorables en todo el intervalo de temperaturas estudiado, pero sin un perjuicio notable en la solubilidad de ácido en el medio de reacción.

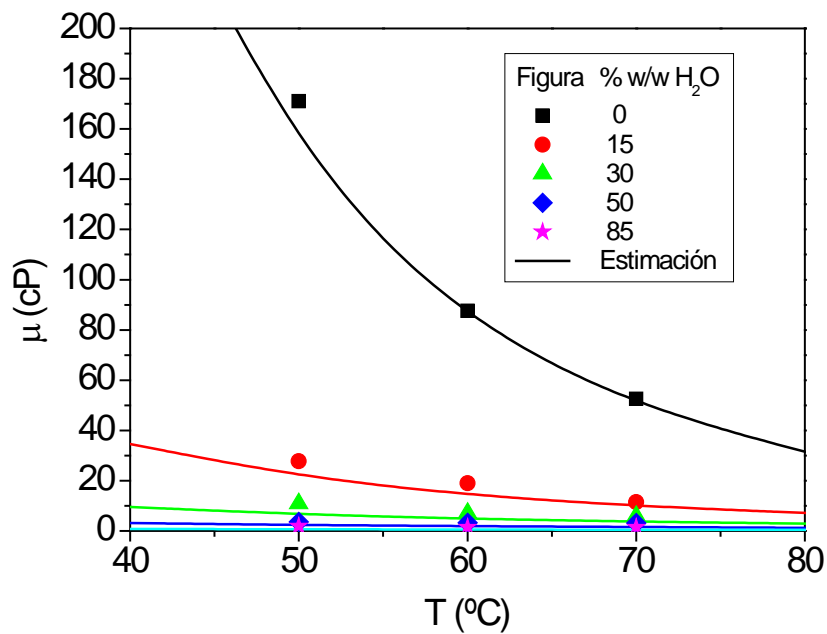


Figura 5.2. Viscosidad de mezclas glicerina/agua. Efecto de la temperatura

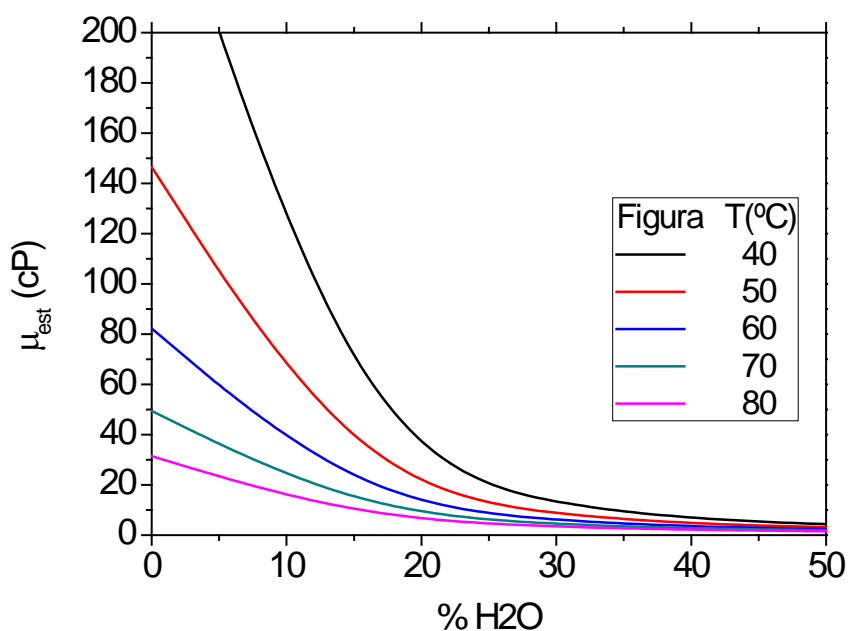


Figura 5.3. Viscosidad de mezclas glicerina/agua. Efecto de la concentración de agua

5.1.3. Estudio de la transferencia de materia

En el Capítulo 4 se ha comprobado la importancia de los fenómenos de transporte en la velocidad de la reacción de esterificación de glicerina y ácido benzoico. Se observó, tanto experimental como teóricamente, que, aunque el transporte externo no representaba una resistencia considerable respecto de la resistencia global de la transformación, sí lo era el transporte en el interior de los poros de la partícula de catalizador. Tanto es así que, en las condiciones de trabajo, se ha calculado un factor de efectividad con un valor tan bajo como 0,3, teniendo como referencia la velocidad observada en condiciones similares con la enzima libre.

El objetivo de este Capítulo es mejorar el sistema de trabajo acelerando los fenómenos de transporte, modificando propiedades, como la viscosidad del medio, por mezcla de la glicerina con agua. En este estudio se descartan las limitaciones al transporte externo, ya que, al no ser importantes en un medio más viscoso, como la glicerina pura, su importancia relativa será incluso menor en mezclas de glicerina con agua. Esta serie de experimentos se centra en la valoración de los problemas difusionales en el interior de la partícula, para lo cual

se ha llevado a cabo una serie de experimentos con enzima inmovilizada de diferentes tamaños de partícula y en medios con varias cantidades de agua.

Las Figuras 5.4, 5.5 y 5.6 recogen los resultados de conversión frente a tiempo obtenidos trabajando en glicerina pura y mezclas 15% y 30% w/w de agua. Se puede observar que, al aumentar la concentración de agua en el medio, las diferencias en las evoluciones de conversión a diferentes tamaños de partícula son menores, sobre todo si se tiene en cuenta las velocidades iniciales de reacción, como se comentará más adelante. Las partículas de menor tamaño favorecen transformaciones más rápidas, aunque la conversión final sea prácticamente la misma, la de equilibrio. El hecho que la conversión final sea ligeramente superior en los dos casos de adición de agua al medio se podría explicar por la evaporación de agua que tiene lugar a lo largo de la reacción al trabajar en un reactor abierto a la atmósfera, que puede estar arrastrando pequeñas cantidades de ácido benzoico, que sublima, y que experimentalmente se ha podido comprobar con la presencia de cristales de benzoico condensado en las paredes secas del reactor.

Sin embargo, si se observan diferencias en el tiempo en que se alcanza el punto de equilibrio, que se va reduciendo de 50 h a 45 h y luego a 30 h, a medida que se aumenta de 0 a 15 y a 30% (w/w) la proporción de agua; todo ello relativo a las partículas de enzima inmovilizada menor tamaño empleadas.

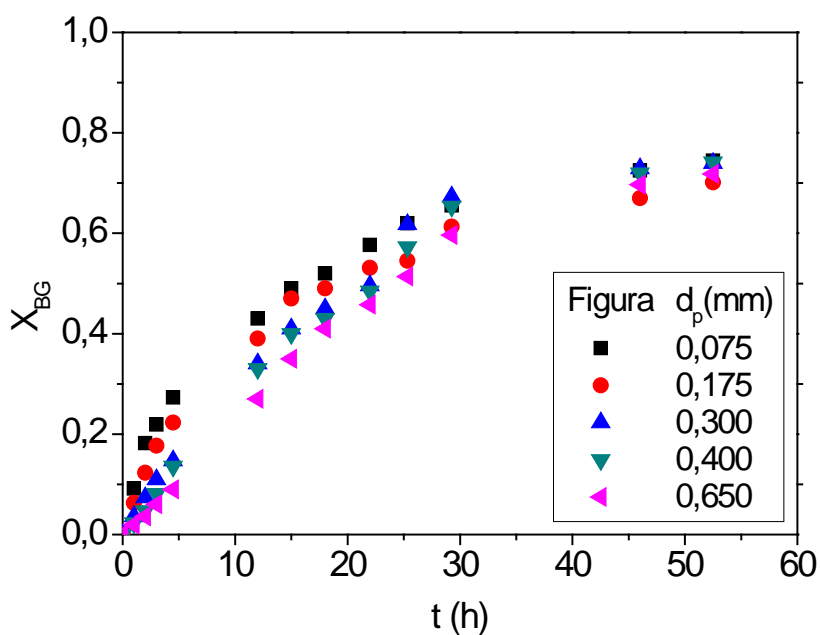


Figura 5.4. Variación de la conversión de monoéster con el tiempo ($C_{B,0}=30\text{g/L}$; $C_W=0\%w/w$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$). Efecto del tamaño de partícula de Novozym®435.

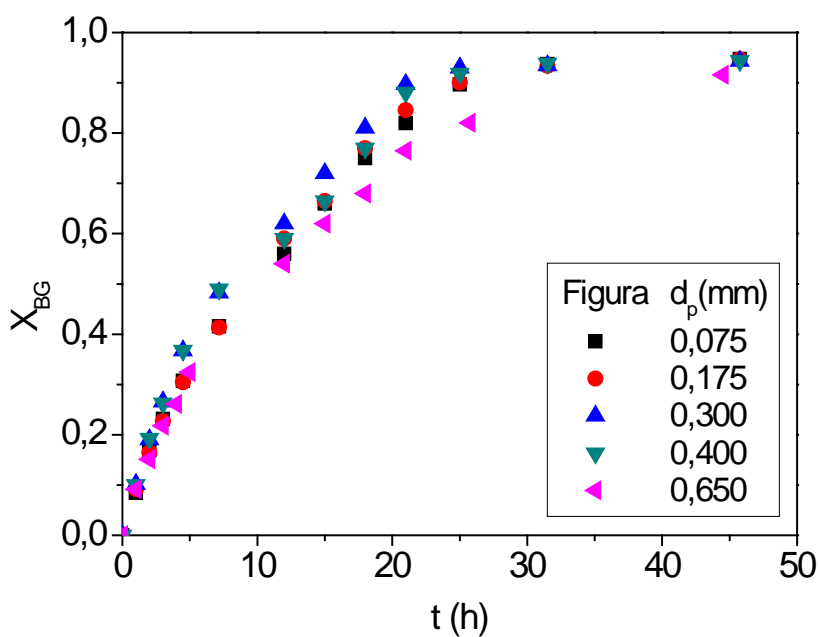


Figura 5.5. Variación de la conversión de monoéster con el tiempo ($C_{B,0}=30\text{g/L}$; $C_W=15\%w/w$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$). Efecto del tamaño de partícula de Novozym®435.

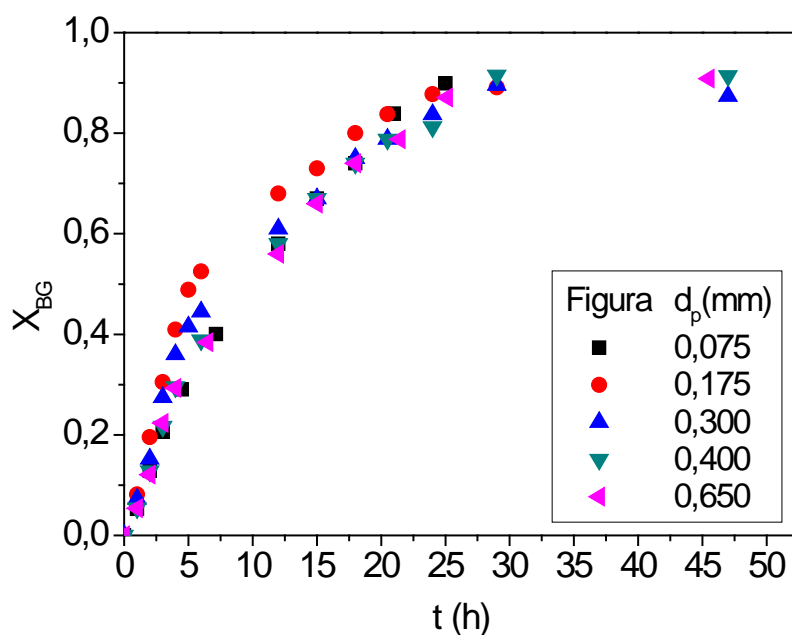


Figura 5.6. Variación de la conversión de monoéster con el tiempo ($C_{B,0}=30\text{g/L}$; $C_W=30\%w/w$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$). Efecto del tamaño de partícula de Novozym®435.

La Figura 5.7 refleja la variación de la velocidad inicial con el tamaño de partícula para todos los experimentos comentados en este apartado. Se puede observar claramente que las limitaciones al transporte se van reduciendo a medida que se incrementa la cantidad de agua en el medio, lo que a efectos prácticos se traduce en velocidades más cercanas a las observadas en condiciones de ausencia de tales limitaciones, que correspondería al caso de la enzima libre, CALBL, y con ello en valores de factor de efectividad mayores, como se puede observar en la Tabla 5.2. Se aprecia que, a la mayor cantidad de agua añadida a la glicerina, hay un factor de efectividad muy cercano a 0,9 para el tamaño de partícula industrial. Este hecho indicaría que la adición de agua en la concentración suficiente supondría casi eliminar la transferencia de materia interna como factor controlante de la velocidad observada, es decir, el sistema se encontraría prácticamente controlado por la velocidad de la reacción enzimática.

A la vista de los resultados de estos experimentos previos, la concentración elegida de agua para mezclarla con la glicerina en el medio de reacción es de un 30% (w/w).

Tabla 5.2 Factor de efectividad de Novozym®435 en diferentes mezclas glicerina-agua (T=60°C)

Medio(% H ₂ O w/w)	η
0	0,20
15	0,56
30	0,89

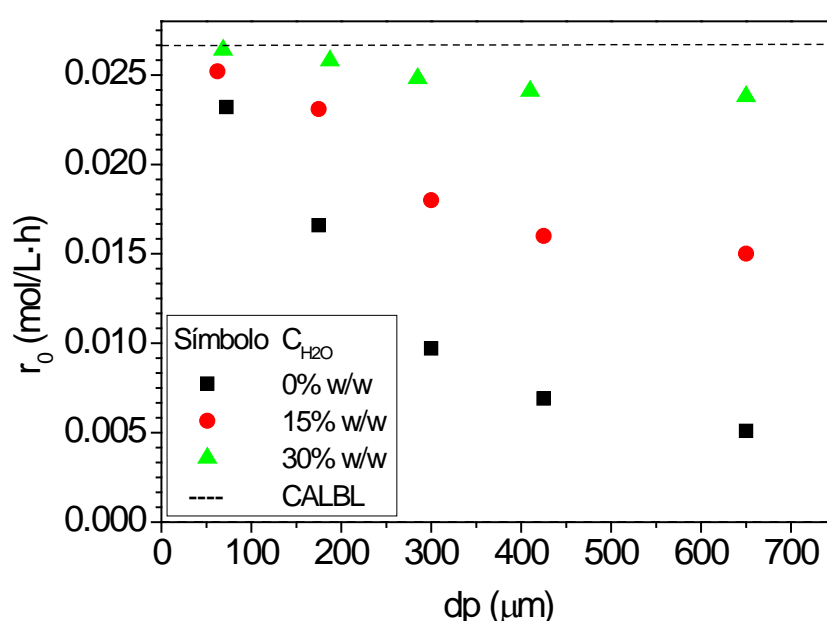


Figura 5.7. Velocidad inicial frente a tamaño de partícula de Novozym®435 en diferentes mezclas glicerina-agua.

5.1.4. Efecto de la temperatura y de la concentración de ácido benzoico

Una vez definido el medio de reacción (30% w/w H₂O), se ha estudiado la influencia de las variables más influyentes en la velocidad de la etapa química, la temperatura y la concentración del ácido benzoico.

Tanto en el estudio de la enzima libre (Capítulo 3), como de la enzima inmovilizada en medio glicerina pura (Capítulo 4), se ha comprobado la

inexistencia de fenómenos de inhibición por productos o sustratos. El efecto de utilizar diferentes concentraciones de ácido en la velocidad inicial de reacción se muestra en la Figura 5.8. La velocidad de reacción tiene una tendencia hiperbólica con la concentración del ácido reactivo. La capacidad del modelo mecanístico de Michaelis-Menten para explicar este comportamiento se ha constatado en los capítulos anteriores de esta Memoria.

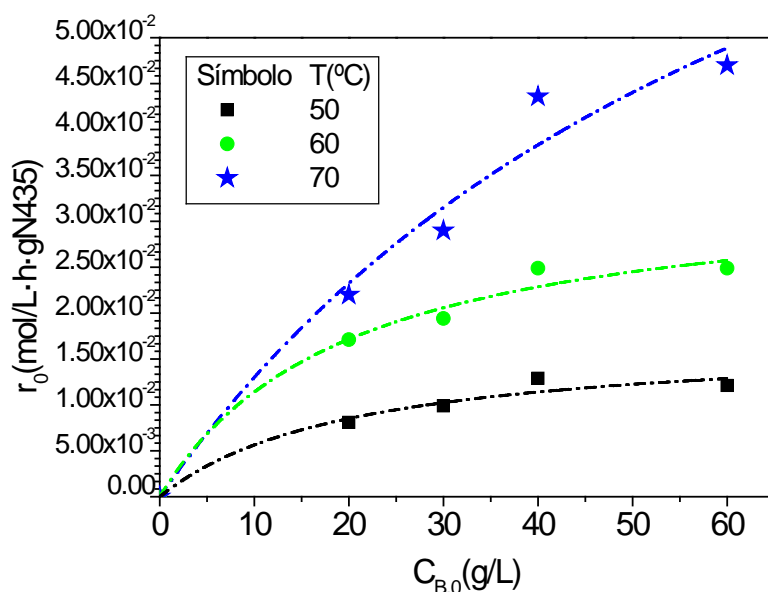


Figura 5.8. Velocidad inicial de reacción frente a concentración inicial de ácido benzoico ($C_W=30\%w/w$; $C_E=30g/L$).

5.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS CINÉTICOS

Se han realizado una serie de experimentos para llevar a cabo el estudio cinético de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina en un medio con 30% (w/w) de agua. Como se ha podido observar en apartados anteriores, el cambio en el medio conlleva un cambio en la solubilidad del ácido benzoico en el medio. Por esta razón, se han elegido diferentes concentraciones de ácido que en casos anteriores, pero que permitan el trabajo en condiciones homogéneas, a temperaturas entre 50 y 70 °C, este límite superior lo determina

la estabilidad del biocatalizador. Estas condiciones se recogen en la Tabla 5.4, donde se describen los experimentos realizados.

Los resultados experimentales obtenidos, como concentración de producto *versus* tiempo, medidos por cromatografía HPLC y ordenados en función de la temperatura de trabajo, se presentan en las Tablas 5.5, 5.6 y 5.7.

Tabla 5.3. Condiciones de operación de experimentos esterificación de ácido benzoico con glicerina (30% H₂O catalizada por Novozym®435 (N=250 rpm; C_E=30 g/L)

Experimento	T (°C)	C_{B,0} (g/L)
W1	50	20
W2	50	30
W3	50	40
W5	60	20
W6	60	30
W7	60	40
W8	70	20
W9	70	30
W10	70	40

Tabla 5.4. Resultados de los experimentos W1 a W3 (T=50°C)

W1	20 g/L		W2	30 g/L	
t (h)	C BG(M)	X BG	t (h)	CBG (M)	X BG
0	0	0	0	0	0
1	0,007	0,043	1	0,006	0,029
2	0,016	0,097	2	0,016	0,071
3,5	0,033	0,198	3	0,028	0,126
5	0,054	0,319	4	0,039	0,173
8	0,071	0,421	6,5	0,066	0,295
11	0,086	0,512	10	0,086	0,385
14	0,099	0,585	13	0,104	0,463
18	0,113	0,668	17	0,126	0,561
22	0,105	0,620	21,5	0,137	0,611
25,5	0,137	0,815	25,2	0,163	0,726
29	0,144	0,852	29	0,169	0,754
35	0,139	0,823	35	0,183	0,816
40	0,142	0,842	40	0,192	0,856
W3	40 g/L				
t (h)	C BG(M)	X BG			
0	0	0			
1	0,014	0,032			
2	0,026	0,058			
3,5	0,054	0,122			
5	0,086	0,193			
8	0,129	0,289			
11	0,171	0,385			
14	0,203	0,456			
18	0,242	0,545			
22	0,246	0,553			
25,5	0,310	0,697			
29	0,339	0,763			
35	0,340	0,766			
40	0,357	0,804			

Tabla 5.5. Resultados de los experimentos W4 a W6 (T=60°C)

W4	20 g/L		W5	30 g/L	
t (h)	C BG(M)	X BG	t (h)	CBG (M)	X BG
0	0	0	0	0	0
1	0,016	0,090	1	0,012	0,054
2	0,034	0,191	2	0,028	0,121
3,5	0,062	0,345	3	0,051	0,223
5	0,085	0,473	4	0,067	0,293
8	0,105	0,586	6,5	0,088	0,384
11	0,123	0,688	10	0,123	0,540
14	0,134	0,745	13	0,142	0,623
18	0,140	0,782	17	0,164	0,716
22	0,134	0,748	21,5	0,169	0,741
25,5	0,150	0,839	25,2	0,199	0,871
29	0,157	0,874	29	0,196	0,855
W6	40 g/L				
t (h)	C BG(M)	X BG			
0	0	0			
1	0,022	0,060			
2	0,044	0,122			
3,1	0,077	0,211			
4	0,097	0,266			
6	0,148	0,404			
11	0,182	0,497			
14	0,207	0,566			
18	0,237	0,647			
22	0,212	0,579			
25	0,257	0,704			
28,5	0,307	0,839			

Tabla 5.6. Resultados de los experimentos W7 a W9 (T=70°C)

W7	20 g/L		W8	30 g/L	
t (h)	C BG(M)	X BG	t (h)	CBG (M)	X BG
0	0	0	0	0	0
1	0,036	0,198	1	0,027	0,116
2	0,044	0,242	2	0,056	0,243
3,5	0,072	0,397	3	0,071	0,309
5	0,112	0,615	4	0,092	0,401
8	0,126	0,695	6,5	0,120	0,524
11	0,141	0,774	10	0,151	0,660
14	0,150	0,825	13	0,166	0,723
18	0,156	0,857	17	0,179	0,782
22	0,148	0,814			
W9	40 g/L				
t (h)	C BG(M)	X BG			
0	0	0			
1	0,044	0,122			
2	0,087	0,240			
3,1	0,120	0,331			
4	0,141	0,387			
6	0,187	0,513			
8	0,214	0,588			
11	0,245	0,673			
14	0,267	0,735			
18	0,284	0,781			

5.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una vez obtenidos los resultados experimentales para la esterificación de ácido benzoico y glicerina en un medio libre de disolventes orgánicos al que se ha añadido un 30% w/w de agua, se ha procedido al estudio cinético. Se busca una expresión matemática que sea capaz de reproducir la evolución de las concentraciones de las diferentes especies observadas de forma experimental a lo largo del proceso de obtención del monoéster.

5.3.1. Determinación del modelo cinético

Las condiciones de exceso de glicerol, en las que se ha trabajado, simplifican el modelo cinético que deriva de un mecanismo “Ping-pong Bi-Bi”, generalmente aceptado para reacciones de esterificación catalizadas por lipasas, a una expresión hiperbólica más sencilla, de tipo Michaelis-Menten, como la Ecuación [5.2]:

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B} \quad [5.21]$$

Ante la ausencia de fenómenos de inhibición o desactivación, que no han sido detectados en los experimentos previos, algo que también se ha podido comprobar con los resultados del estudio cinético de la reacción de esterificación de ácido benzoico con Novozym®435 en glicerina pura, se puede pensar que un modelo cinético de este tipo, puede ajustarse correctamente a los datos experimentales, también en este caso, cuando el medio de reacción está formado por glicerina mezclada con agua.

Una vez más, se ha aplicado el método integral, ajustando la Ecuación [5.2] a los datos de cada experimento por separado, en primer lugar, y posteriormente, una vez comprobado el sentido físico de los parámetros obtenidos, a los datos de todos los experimentos simultáneamente, para determinar los valores óptimos de los parámetros cinéticos, k y K . Estos parámetros se han considerado dependientes de la temperatura según la

expresión de Arrhenius (Ecuación [3.4]) y se determinarán por ajuste no lineal, aplicando el criterio de los mínimos cuadrados.

En la Tabla 5.7 se recogen los valores obtenidos del ajuste de todos los experimentos a la vez, así como los resultados de los parámetros estadísticos más relevantes. Los valores de los parámetros estadísticos son muy aceptables, indicando la bondad de este ajuste, algo que es, además, evidente, si se compara lo estrecho del intervalo de confianza calculado para el valor de cada una de las constantes cinéticas calculados. Además, si se observa la gráfica de residuos (Figura 5.9) se comprueba que el error tiene un valor despreciable, sólo tiene un valor a considerar a tiempos cortos de reacción. Esto se debe únicamente al pequeño peso que estos puntos tienen, en valor absoluto, sobre el ajuste en su conjunto, como se puede confirmar atendiendo a la proximidad de los datos simulados con los experimentales en las Figuras 5.10, 5.11 y 5.12.

Tabla 5.7. Modelo cinético propuesto para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina catalizada por Novozym®435 en medio 30% w/w H₂O.

$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}; \text{ Con } k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_{a,k}}{RT}}$				
Parámetro	Valor ± error	SQR	F95	AICc
Ea k (J/mol)	3,77·10 ⁴ ± 2,19·10 ³	2,89·10 ⁻²	4,17·10 ³	-1.1·10 ³
lnk ₀	-7,25 ± 0,79			
K (M)	4,86·10 ⁻¹ ± 1,3·10 ⁻²			

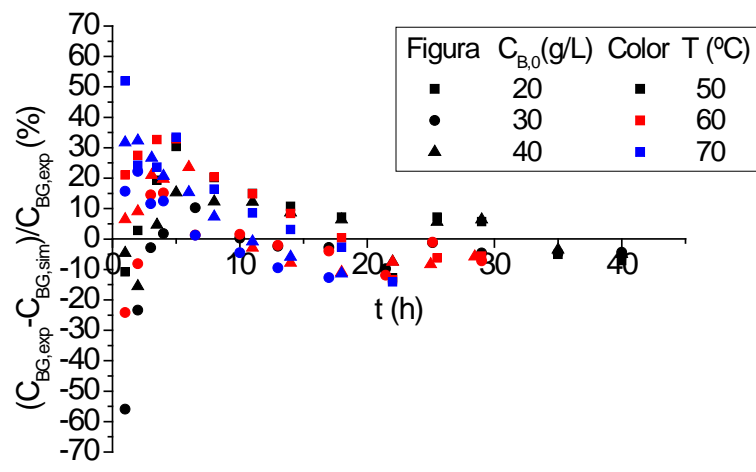


Figura 5.9. Análisis de residuos del ajuste del modelo cinético Michaelis-Menten a los datos experimentales.

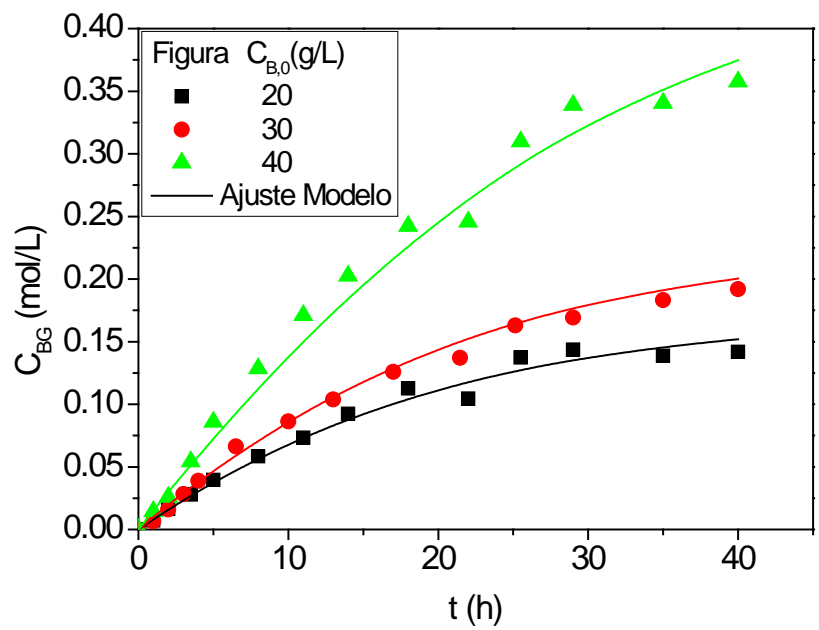


Figura 5.10. Ajuste a datos experimentales modelo Michaelis-Menten (T=50°C)

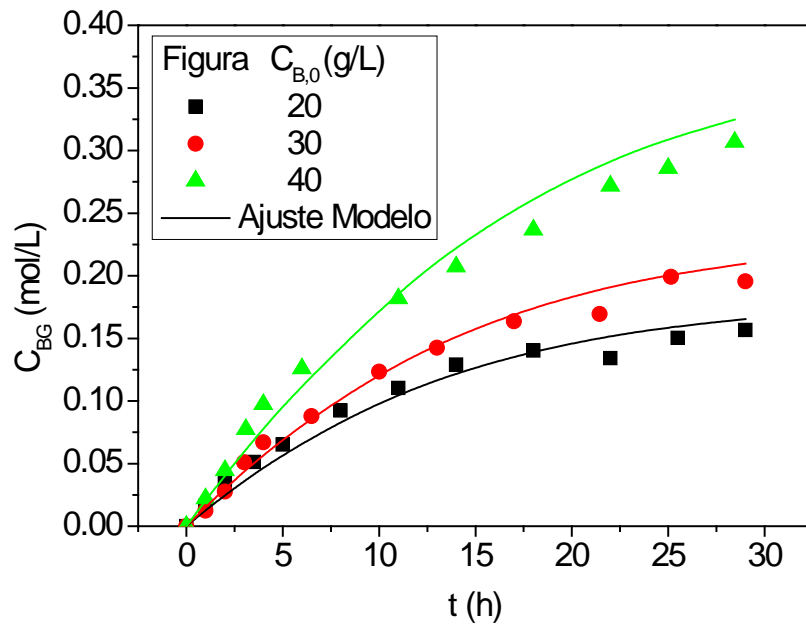


Figura 5.11. Ajuste a datos experimentales modelo Michaelis-Menten ($T=60^{\circ}\text{C}$)

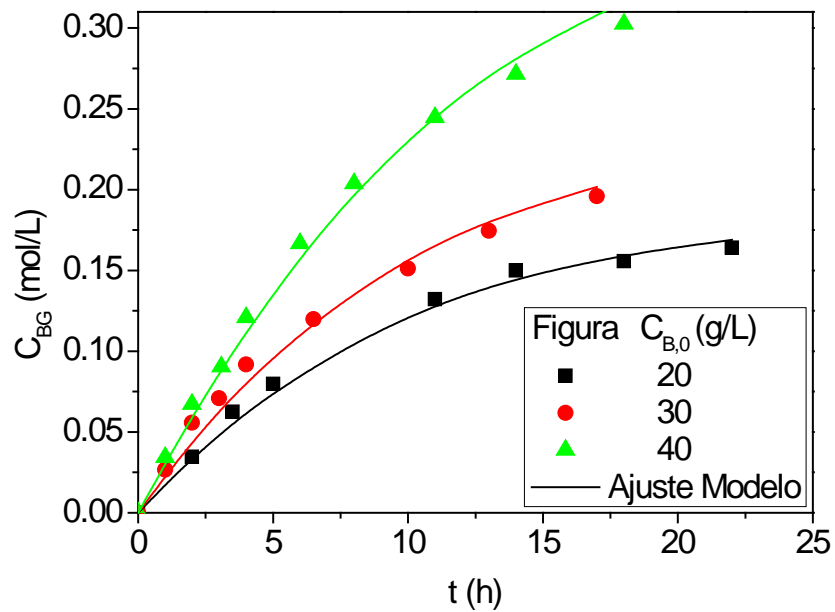


Figura 5.12. Ajuste a datos experimentales modelo Michaelis-Menten ($T=70^{\circ}\text{C}$)

Si se comparan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos en los distintos sistemas estudiados hasta ahora (Tabla 5.8), se pueden hacer varias observaciones interesantes. Por una parte, si se relacionan las energías de activación de los sistemas que utilizan enzima inmovilizada como catalizador, tanto en condiciones de limitación al transporte interno como en ausencia de ellas, se obtiene:

$$\frac{[E_{a,k}]_{G,pura}}{[E_{a,k}]_{G,30\%H_2O}} = \frac{1,43 \cdot 10^4}{3,77 \cdot 10^4} = 0,4$$

Esta relación es muy cercana al valor teórico de 0,5 que se puede encontrar en la bibliografía para cualquier reacción catalítica heterogénea con control difusional (Roberts y col., 1965, 1966). Aceptando el error experimental razonable en el cálculo de las velocidades de reacción, este valor indicaría que la reacción en un medio que contiene un 30% de agua transcurre en condiciones de control cinético por parte de la reacción química. En ausencia de agua, el control es debido a la transferencia de materia en los poros.

Por otra parte, se puede comprobar que, en condiciones en las que se da ausencia de limitaciones al transporte, el valor de la energía de activación de la reacción de esterificación con enzima libre es algo superior al valor correspondiente al de la reacción catalizada por la enzima inmovilizada, algo que es muy razonable teniendo en cuenta que la influencia de la temperatura es bastante inferior en los datos experimentales conseguidos cuando el catalizador es una enzima inmovilizada, fijada a un soporte sólido. Este efecto sobre la energía de activación es tanto más evidente cuanto más importante es el efecto de limitación difusional: la energía de activación es muy inferior en condiciones en las que se utiliza la enzima inmovilizada, Novozym 435, en glicerina pura frente a la que se obtiene en condiciones en las que se añade agua, que, como ya se ha comentado, mejora notablemente la velocidad de la transferencia de materia en los poros. Por otra parte, la mayor susceptibilidad de las moléculas de la enzima libre a sufrir cambios con la temperatura la hace más propensa a la desactivación, como de hecho se ha observado tanto experimentalmente como en el desarrollo del modelo cinético en el Capítulo 3.

Finalmente, es interesante observar lo cercanos que son los valores de la constante K, que es representativa de la intensidad de las interacciones enzima-sustrato, y que al ser ésta la misma en todos los sistemas, es de esperar que resulten valores muy similares. Esta constante es, en estos sistemas, reflejo de las constantes de Michaelis-Menten para el ácido y para la glicerina, una en el numerador y otra en el denominador, además de incluir la concentración de la glicerina, que se puede considerar constante por estar la glicerina en gran exceso. Como las constantes de Michaelis-Menten no dependen mucho de la temperatura y, por otra parte, ese encuentran en esta constante de tal forma que tal efecto se anula, se puede concluir que la constante K no debería ser función de la temperatura.

Tabla 5.8. Parámetros cinéticos de modelos determinados para la esterificación de ácido benzoico y glicerina con enzima libre e inmovilizada en diferentes medios.

Catalizador	Disolvente	$E_{a,k}$ (J/mol)	$\ln k_0$	K (M)
CALBL	glicerina pura	$4,55 \cdot 10^4$ $\pm 1,76 \cdot 10^3$	5,46 $\pm 6,46 \cdot 10^{-1}$	$4,27 \cdot 10^{-1}$ $\pm 2,53 \cdot 10^{-3}$
Novozym®435	glicerina pura	$1,43 \cdot 10^4$ $\pm 1,39 \cdot 10^3$	-2,08 $\pm 0,50$	$4,58 \cdot 10^{-1}$ $\pm 9 \cdot 10^{-3}$
Novozym®435	glicerina con 30% w/w de H ₂ O	$3,77 \cdot 10^4$ $\pm 2,19 \cdot 10^3$	-7,25 $\pm 0,79$	$4,86 \cdot 10^{-1}$ $\pm 1,3 \cdot 10^{-2}$

5.4. ESTUDIO TEÓRICO DEL TRANSPORTE DE MATERIA

De forma análoga a lo realizado para los resultados experimentales de la producción de monobenzoato de glicerina en glicerina pura, se va a estudiar de una forma teórica los fenómenos de transporte de materia en el sistema, ahora en el medio con 30% w/w H₂O, para poder cuantificar su importancia.

Utilizando las ecuaciones de Cheng (Cheng, 2008) para determinar la viscosidad de la mezcla y las ecuaciones de Wilke–Chang (Ecuación 4.9) y la correlación de Frössling (Ecuación 4.5) para el cálculo de la difusividad molecular, $D_{B,G}$ y el coeficiente de transferencia de materia, $k_{L,B}$, y estimando el resto de propiedades termodinámicas y fluidodinámicas tal como se ha explicado en el apartado 4.4.1, se obtienen los valores que se recogen en la Tabla 5.9.

Así, para la cuantificación de las limitaciones al transporte de materia externo e interno, se han aplicado los criterios de Mears (Ecuación 4.14) y Weisz-Prater (Ecuación 4.15), para las condiciones extremas del intervalo de condiciones de operación estudiado. Estos valores, junto con los valores observados de velocidad de reacción inicial, se presentan en la Tabla 5.10.

Si se aplican los criterios antes descritos, se obtiene que $C_M \ll 0,15$. Esto quiere decir que, en el caso del transporte externo, incluso en el caso más limitante en cuanto al transporte de materia que corresponde a condiciones de temperatura baja, el transporte externo es muy rápido comparado con la velocidad del proceso global y, por tanto, no influye en dicha velocidad.

Para el transporte interno, también resulta $C_{W-P} \ll 1$, de forma que también pueden descartarse limitaciones a la difusión de materia en el interior de los poros de la partícula de Novozym®435. De esta forma, se puede garantizar, también de forma cuantitativa, que la adición de agua al medio de reacción es una estrategia exitosa como vía para reducir los problemas difusionales encontrados en el sistema al trabajar con un disolvente muy viscoso y un catalizador heterogéneo, un sólido con una porosidad pequeña debido a la inmovilización en corona de la CALB en la superficie del soporte casi taponando los poros.

Tabla 5.9. Propiedades fluidodinámicas estimadas para diferentes condiciones de trabajo.

T (°C)	30% w/w H ₂ O		
	μ_G (cP)	$D_{B,G}^0$ (cm ² /s)	$k_{L,B}$ (cm/s)
40	9,53	$2,10 \cdot 10^{-6}$	$6,99 \cdot 10^{-5}$
50	6,65	$3,10 \cdot 10^{-6}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
60	4,85	$4,38 \cdot 10^{-6}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$
70	3,67	$5,96 \cdot 10^{-6}$	$1,99 \cdot 10^{-4}$
80	2,87	$7,85 \cdot 10^{-6}$	$2,62 \cdot 10^{-4}$

Tabla 5.10. Velocidades observadas en extremos de intervalo de temperaturas

T (°C)	$C_{B,0}$ (g/L)	r_0 (mol/L·h)
50	30	$9,9 \cdot 10^{-3}$
70	30	$2,9 \cdot 10^{-2}$

Tabla 5.11. Criterio de Mears (transporte externo) para condiciones extremas del intervalo de trabajo.

T (°C)	$C_{B,0}$ (g/L)	C_M
50	30	$3,25 \cdot 10^{-3}$
70	30	$6,66 \cdot 10^{-2}$

Tabla 5.12. Criterio de Weisz-Prater (transporte interno) para condiciones extremas del intervalo de trabajo.

T (°C)	$C_{B,0}$ (g/L)	C_{WP}
50	30	$6,35 \cdot 10^{-2}$
70	30	$9,67 \cdot 10^{-2}$

5.5. ESTERIFICACIÓN EN CONDICIONES DE SOBRESATURACIÓN

La mezcla de agua con glicerina tiene, como se ha visto en el desarrollo de este capítulo, efectos muy positivos sobre la cinética de la producción del monoglicérido, MG, pero, como contrapartida, limita mucho la solubilidad del ácido benzoico.

Pensando en la viabilidad industrial de un proceso como el que se plantea en este trabajo, es necesario buscar vías para mejorar la productividad, operando con este sistema. Se puede pensar, por ejemplo, en la sobresaturación del medio, es decir, la concentración del medio en ácido benzoico por encima de su punto de solubilidad.

La reacción tendrá lugar en dos etapas:

- En condiciones de sobresaturación. Sistema bifásico benzoico-glicerina.
- En condiciones homogéneas. Benzoico disuelto en glicerina

En la primera etapa, la concentración de ácido benzoico se puede considerar constante y, como se puede observar en la Figura 5.13, es independiente de la cantidad inicial de ácido en la mezcla debido a que, en cualquier caso, sólo podrá reaccionar el ácido benzoico en disolución, concentración que, para un disolvente dado, sólo depende de la temperatura. En estas condiciones la velocidad de reacción será constante (orden 0 de reacción).

Una vez el ácido se ha ido consumiendo y su concentración en la mezcla heterogénea es menor que el punto de solubilidad, el sistema se convierte en homogéneo y la velocidad pasa a ser dependiente de la concentración de ácido (expresión Michaelis-Menten), ya que ahora varía con el tiempo.

Los resultados de la simulación de estas condiciones, utilizando los parámetros cinéticos calculados (Tabla 5.7) resultan bastante apropiados y se acercan mucho a los datos experimentales. Esto valida el modelo obtenido en este Capítulo, por un lado, y abre las puertas a una nueva posible forma de

trabajar en la producción de monoésteres de ácidos con solubilidades pobres en medios como la glicerina o mezclas glicerina-agua.

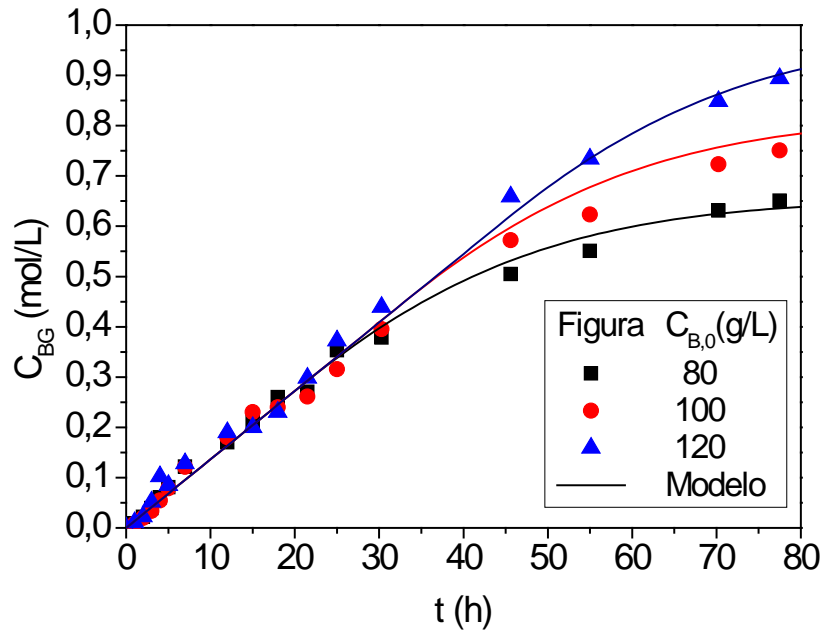


Figura 5.13. Datos experimentales y predicción del modelo cinético para la producción de BG en condiciones de sobresaturación de ácido benzoico.

5.6. BIBLIOGRAFIA

- Biard, P.-F. y A. Couvert (2013). "Overview of mass transfer enhancement factor determination for acidic and basic compounds absorption in water." *Chemical Engineering Journal* **222**(1): 444-453.
- Blanco, R. M.; P. Terreros; N. Muñoz y E. Serra (2007). "Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **47**(1–2): 13-20.
- Cao, L.; L. v. Langen y R. A. Sheldon (2003). "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?" *Current Opinion in Biotechnology* **14**(4): 387-394.
- Cruz, J.; O. Barbosa; R. C. Rodrigues; R. Fernandez-Lafuente; R. Torres y C. Ortiz (2012). "Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **80**(1): 7-14.
- Chen, B.; M. E. Miller y R. A. Gross (2007). "Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity." *Langmuir* **23**(11): 6467-6474.
- Cheng, N.-S. (2008). "Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **47**(9): 3285-3288.
- Du, J.; X. Lai; N. Yang; J. Zhai; D. Kisailus; F. Su; D. Wang y L. Jiang (2010). "Hierarchically Ordered Macro–Mesoporous TiO₂–Graphene Composite Films: Improved Mass Transfer, Reduced Charge Recombination, and Their Enhanced Photocatalytic Activities." *ACS Nano* **5**(1): 590-596.
- Galvis, M.; O. Barbosa; M. Ruiz; J. Cruz; C. Ortiz; R. Torres y R. Fernandez-Lafuente (2012). "Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates." *Process Biochemistry* **47**(12): 2373-2378.
- Groen, J. C.; W. Zhu; S. Brouwer; S. J. Huynink; F. Kapteijn; J. A. Moulijn y J. Pérez-Ramírez (2006). "Direct Demonstration of Enhanced Diffusion in Mesoporous ZSM-5 Zeolite Obtained via Controlled Desilication." *Journal of the American Chemical Society* **129**(2): 355-360.
- Hasan, N. y B. Farouk (2013). "Mass transfer enhancement in supercritical fluid extraction by acoustic waves." *The Journal of Supercritical Fluids* **80**(0): 60-70.
- Høegh, I.; S. Patkar; T. Halkier y M. T. Hansen (1995). "Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*." *Canadian Journal of Botany* **73**(S1): 869-875.
- Jeon, S. J.; A. Pawelski; M. Kraume y W. H. Hong (2011). "Mass transfer enhancement by the alkaline hydrolysis of ethyl acetate in a single droplet system." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **17**(4): 782-787.
- Kobayashi, T.; T. Matsuo; Y. Kimura y S. Adachi (2008). "Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**(11): 1041-1044.

- Ladero, M.; A. Santos y F. García-Ochoa (2001). "Diffusion and chemical reaction rates with nonuniform enzyme distribution: An experimental approach." *Biotechnology and Bioengineering* **72**(4): 458-467.
- Lu, J.-G.; Y.-F. Zheng; M.-D. Cheng y L.-J. Wang (2007). "Effects of activators on mass-transfer enhancement in a hollow fiber contactor using activated alkanolamine solutions." *Journal of Membrane Science* **289**(1–2): 138-149.
- Painmanakul, P.; K. Loubière; G. Hébrard; M. Mietton-Peuchot y M. Roustan (2005). "Effect of surfactants on liquid-side mass transfer coefficients." *Chemical Engineering Science* **60**(22): 6480-6491.
- Porrás-Parral, G.; T. Miri; S. Bakalis y P. Fryer (2011). "The effect of electrical processing on mass transfer and mechanical properties of food materials." *Procedia Food Science* **1**(0): 76-80.
- Prathumpai, W.; S. Flitter; M. McIntyre y J. Nielsen (2004). "Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**(6): 714-719.
- Reay, D.; C. Ramshaw y A. Harvey (2013). "Chapter 3 - The Mechanisms Involved in Process Intensification". *Process Intensification* (Second edition). Oxford, Butterworth-Heinemann: 57-90.
- Ren, Y.; J. Rivera; L. He; H. Kulkarni; D.-K. Lee y P. Messersmith (2011). "Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating." *BMC Biotechnology* **11**(1): 63.
- Roberts, G. W. y C. N. Satterfield (1965). "Effectiveness Factor for Porous Catalysts. Langmuir-Hinshelwood Kinetic Expressions." *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* **4**(3): 288-293.
- Roberts, G. W. y C. N. Satterfield (1966). "Effectiveness Factor for Porous Catalysts. Langmuir-Hinshelwood Kinetic Expressions for Bimolecular Surface Reactions." *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* **5**(3): 317-325.
- Ruthiya, K. C.; J. van der Schaaf; B. F. M. Kuster y J. C. Schouten (2003). "Mechanisms of physical and reaction enhancement of mass transfer in a gas inducing stirred slurry reactor." *Chemical Engineering Journal* **96**(1–3): 55-69.
- Schönfeld, H.; K. Hunger; R. Cecilia y U. Kunz (2004). "Enhanced mass transfer using a novel polymer/carrier microreactor." *Chemical Engineering Journal* **101**(1–3): 455-463.
- Serra, E.; Á. Mayoral; Y. Sakamoto; R. M. Blanco y I. Díaz (2008). "Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters." *Microporous and Mesoporous Materials* **114**(1–3): 201-213.
- Sharma, R.; Y. Chisti y U. C. Banerjee (2001). "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnology Advances* **19**(8): 627-662.
- Takahashi, H.; B. Li; T. Sasaki; C. Miyazaki; T. Kajino y S. Inagaki (2000). "Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes

Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica." *Chemistry of Materials* **12**(11): 3301-3305.

Taqvi, S.; A. Vishnoi y M. D. Levan (1997). "Effect of macropore convection on mass transfer in a bidisperse adsorbent particle." *Adsorption* **3**(2): 127-136.

Thomas, A. M. y R. Narayanan (2002). "A comparison between the enhanced mass transfer in boundary and pressure driven oscillatory flow." *International Journal of Heat and Mass Transfer* **45**(19): 4057-4062.

6.- Esterificación de Glicerina y Ácido p-Metoxicinámico con Novozym®435

6. ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA Y ÁCIDO METOXICINÁMICO CON NOVOZYM®435

A lo largo de los Capítulos 3, 4 y 5 de este trabajo se ha profundizado en el conocimiento de la esterificación de glicerol con ácido benzoico para la producción de monoéster extremo. Como catalizadores se ha trabajado tanto con lipasa B de *Candida antarctica* como con uno de sus preparados inmovilizados, Novozym®435. Su estudio ha conducido a la selección de unas condiciones propicias para la producción del monoglicérido, escalables a una escala semipreparativa.

El presente capítulo persigue la aplicación de este conocimiento obtenido con otros ácidos aromáticos cuyos monoglicéridos tienen interés industrial. Entre ellos, el ácido p-metoxicinámico y sus ésteres tienen un especial interés, debido a sus propiedades como filtro ultravioleta, motivo por el que se emplean como ingredientes en cremas solares dentro de la industria cosmética (Moliner y col., 2013), además de aplicaciones como emulsionante, dispersante o lubricante (Aleksey y col., 1994; Thengumpillil, 2001; Pagliaro y col., 2008).

La reacción en cuestión es la esterificación de una molécula de ácido p-metoxicinámico (M) con una de glicerol (G), para obtener una molécula de α -mono-p-metoxicinamato de glicerina (MG), tal como se representa en el esquema (Figura 6.1):

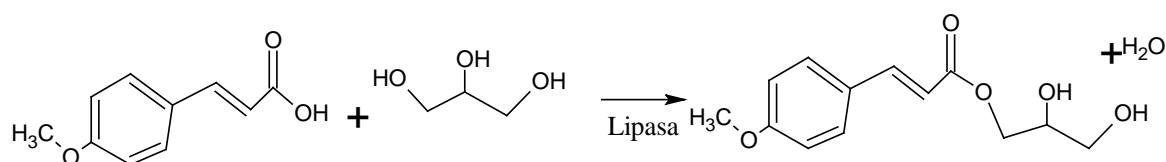


Figura 6.1. Esquema de la esterificación de ácido p-metoxicinámico con glicerol catalizada por lipasas.

A diferencia de la síntesis tradicional de monoésteres con catalizadores químicos, ácidos o básicos, como Amberlyst 15, 35 y 36 (resinas ácidas fuertes

de Dow Chemical) (Saha y col., 1996; Yadav y col., 2002; Orjuela y col., 2012), la reacción con lipasas tiene lugar en condiciones más moderadas, algo que es importante al trabajar con productos que pueden deteriorarse al estar sometidos a altas temperaturas, como es el caso del MG. Es por esta razón que el estudio de este sistema biocatalítico es especialmente interesante.

6.1. EXPERIMENTOS PREVIOS

De forma similar a lo realizado con el ácido benzoico, es necesario conocer el efecto de las variables sobre la reacción de esterificación a monoglicérido extremo de ácido p-metoxicinámico, MG, para delimitar las condiciones de operación.

En este apartado de experimentación previa, se ha estudiado:

- Solubilidad del ácido p-metoxicinámico en glicerina y mezclas de glicerina y agua en distintos grados.
- Estudio de la transferencia de materia

6.1.1. Solubilidad de ácido metoxicinámico en mezclas glicerina/agua

Las propiedades de un compuesto químico vienen determinadas por su estructura, ya que ésta determina la forma en la que tienen lugar las interacciones de una molécula con su entorno, esto es, como se disuelve en el medio y su reactividad.

El ácido p-metoxicinámico y el benzoico tienen como base estructural un anillo aromático, pero se diferencian en los radicales a los que éste se encuentra enlazado (ver Figura 6.2). El ácido p-metoxicinámico tiene un grupo vinílico al que se enlaza el grupo carboxílico. Esta estructura de dobles enlaces conjugados, sumado al grupo metoxi en posición para, le dan a la molécula una mayor resonancia y estabilidad. Estas características son precisamente las que le confieren sus propiedades como filtro ultravioleta, pero, al mismo tiempo, la

convierten en una especie más hidrofóbica, por lo que su disolución en un medio polar como la glicerina se verá más limitada.

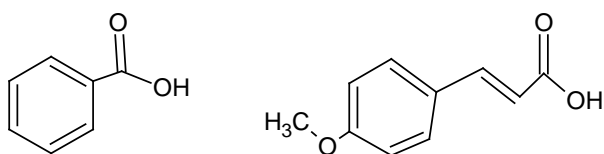


Figura 6.2. Estructura de ácido benzoico (izq.) y p-metoxicinámico (der.)

Se ha estudiado experimentalmente la solubilidad del ácido p-metoxicinámico tanto en glicerina como en mezclas glicerina-agua en distintas proporciones. En la Figura 6.3 se puede observar como mayores concentraciones de agua en la mezcla con glicerina, reducen el valor límite de solubilidad a cualquier temperatura. Como ya se ha comentado al analizar la estructura de su molécula, el carácter lipofílico del ácido metoxicinámico hace difícil su disolución en medios polares, como es el caso del glicerol, y ésta es aún más complicada a medida que aumenta la polaridad del medio de reacción al añadir agua a la glicerina. Tal es el efecto de la naturaleza apolar de los sustituyentes del anillo aromático, que los valores de solubilidad del ácido metoxicinámico resultan un orden de magnitud inferiores a los del ácido benzoico.

Se observa, además, la tendencia de aumento exponencial de la solubilidad de este ácido con la temperatura; tendencia que, por otro lado, es más suave a medida que se incrementa la polaridad del medio.

Los valores medidos experimentalmente se pueden ajustar a una curva en la que la solubilidad es función del tiempo, del tipo:

$$C_M = n \cdot e^{\left(\frac{-T}{m}\right)} \quad [6.1]$$

Los resultados de estos ajustes se recogen en la Tabla 6.1.

La solubilidad del ácido p-metoxicinámico en glicerina y en sus mezclas con agua resulta, a priori, uno de los factores que más puede influir en la aplicación de este sistema de trabajo para la síntesis de su monoglicérido. Trabajar con un compuesto poco soluble necesariamente implica operar en concentraciones muy diluidas, para trabajar en condiciones homogéneas, lo cual es poco favorable en términos de productividad, pero que hay que considerar los aspectos positivos del trabajo en condiciones más suaves para un producto termosensible, condiciones propias de la síntesis enzimática.

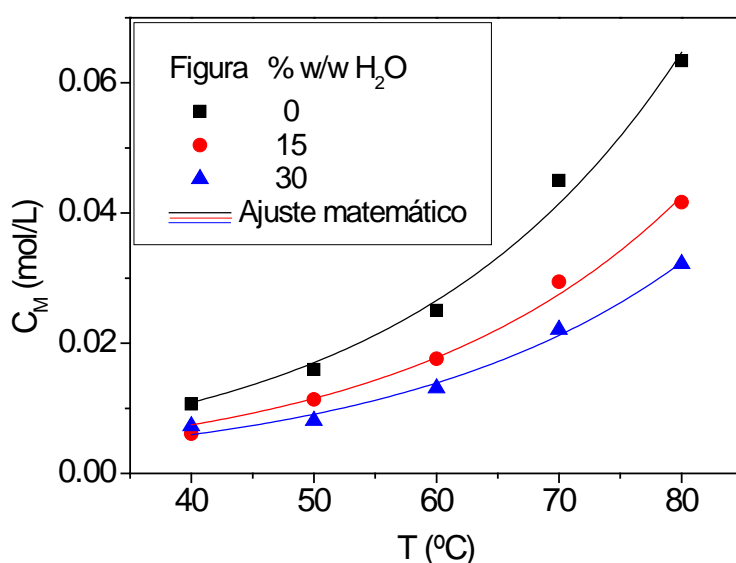


Figura 6.3. Solubilidad de ácido metoxicinámico en distintas mezclas glicerina/agua.

Tabla 6.1. Ajuste exponencial a los datos experimentales de solubilidad de ácido metoxicinámico en mezclas glicerina/agua

$C_M = n \cdot e^{\left(\frac{-T}{m}\right)}; \text{ con } [C_M] = \text{mol/L y } [T] = \text{°C}$			
% w/w H ₂ O	n	m	R ²
0	$1,84 \cdot 10^{-3} \pm 4,2 \cdot 10^{-4}$	$-22,5 \pm 1,6$	0,9876
15	$1,30 \cdot 10^{-3} \pm 2,6 \cdot 10^{-4}$	$-23,0 \pm 1,5$	0,9897
30	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-4}$	$-23,6 \pm 1,6$	0,9874

6.1.2. Estudio de la transferencia de materia

De forma análoga a lo realizado en los Capítulos 4 y 5 con el ácido benzoico, en este apartado se estudia el efecto de las variables que, dada la experiencia recabada a lo largo de este trabajo, pueden afectar de forma significativa a la transferencia de materia del sistema, ya que estos fenómenos se han comprobado de una importancia trascendental en la síntesis del monoglicérido catalizada por Novozym®435.

Se ha estudiado el efecto de la concentración de agua como parte de la mezcla con la glicerina conformando el medio de reacción, así como el efecto del diámetro de partícula.

Efecto de la concentración inicial de agua

Se ha evaluado el efecto que tiene la adición de agua al medio de reacción sobre la reacción de esterificación de glicerina y ácido metoxicinámico,. En la Figura 6.4 se puede observar que la presencia de agua en el medio favorece la transformación a monoéster. Al contrario de lo que cabría esperar, el agua, que es un producto de reacción en gran exceso, no desplaza el equilibrio hacia los reactivos. Parece más importante su influencia sobre la cinética del sistema (ver Figura 6.5), ya que, como se ha comprobado en los capítulos anteriores de este trabajo, modifica considerablemente la hidrodinámica del medio y facilita la difusión de reactivos y productos hacia y desde el centro activo de la lipasa. Se observa también, que el aumento en la velocidad de reacción a medida que se incrementa la cantidad inicial de agua en el medio llega a un punto de saturación a 20% w/w de H₂O, a partir del cual la velocidad inicial de esterificación no aumenta. Más que un efecto propio de la cantidad de agua sobre la velocidad de reacción, es posible que se esté observando el efecto de una concentración de ácido algo menor en disolución debido a que se está trabajando en condiciones muy en el límite de solubilidad del ácido p-metoxicinámico.

El glicerol, por otro lado y dada su elevada afinidad por el agua, podría reducir la acumulación de esta última cerca del centro activo del catalizador, evitando perjudicar el equilibrio de la reacción de esterificación. Además, se ha

comprobado ya que la presencia de agua es fundamental para mantener la estructura de la lipasa de forma que se prolongue su actividad y estabilidad (Kobayashi y col., 2008). Todo esto conduce a la conclusión de que para la producción de mono-p-metoxicinamato de glicerol, MG, será beneficioso utilizar un medio en el que se mezcle glicerol y agua.

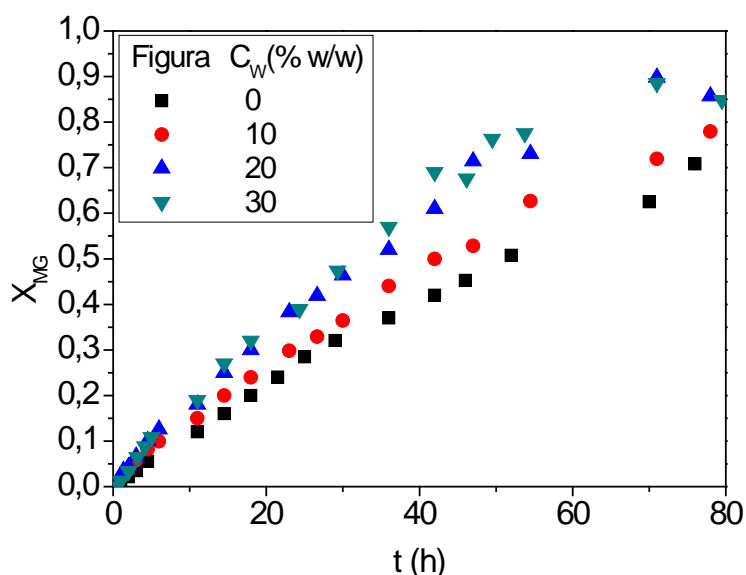


Figura 6.4. Variación de la conversión de monoéster con el tiempo ($C_{M,0}=20\text{g/L}$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$). Efecto de la concentración de agua inicial.

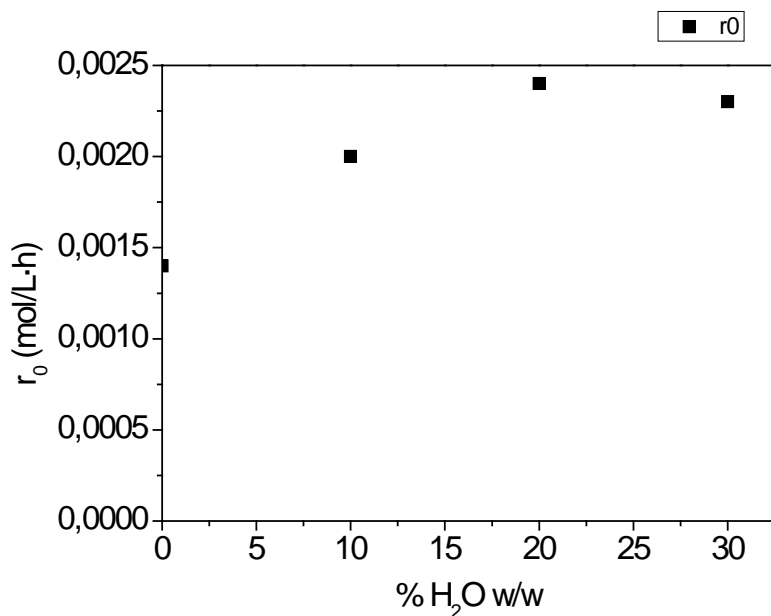


Figura 6.5. Velocidad inicial de reacción frente a concentración inicial de agua ($C_{M,0}=20\text{g/L}$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$)

Efecto del tamaño de partícula

Debido a las grandes limitaciones al transporte detectadas en el interior de la partícula del preparado inmovilizado de CALB, Novozym®435, en este apartado, se estudia la importancia de las limitaciones al transporte interno en la producción de mono-p-metoxicinamato de glicerol y, para ello, se han realizado dos tandas de experimentos, tanto en medio glicerina como en una mezcla de agua 30%w/w en glicerina en los cuales se ha utilizado enzima inmovilizada que se ha molido y tamizado para obtener fracciones de diferente tamaño de partícula. Estos resultados se presentan en las Figuras 6.6 y 6.7. La primera de ellas corresponde a experimentos realizados en glicerina pura; en ellos se observa que el tamaño de partícula influye considerablemente en la velocidad inicial de reacción, algo que es un indicio de la existencia de problemas de transferencia de materia lenta en el interior de los poros de la partícula de Novozym®435. El efecto es notable, de forma que el equilibrio se alcanza más rápidamente cuando el tamaño de partícula es menor. Si se calcula un factor de efectividad, se obtienen valores de alrededor de 0,6 para la partícula nativa de Novozym®435.

Sin embargo, al trabajar en medio 30% w/w H₂O, el efecto de reducir el tamaño de partícula es imperceptible, de forma que es muy probable que se esté operando en condiciones de ausencia de limitaciones al transporte, con factores de efectividad de 0,96, prácticamente el 100% de aprovechamiento de la capacidad catalítica disponible suponiendo $\eta=1$ para el valor asintótico de velocidad inicial que se va alcanzando a menores diámetros de partícula. Esto se pone de manifiesto si se analizan las velocidades iniciales de reacción (Figura 6.8), prácticamente iguales independientemente del tamaño de partícula del catalizador.

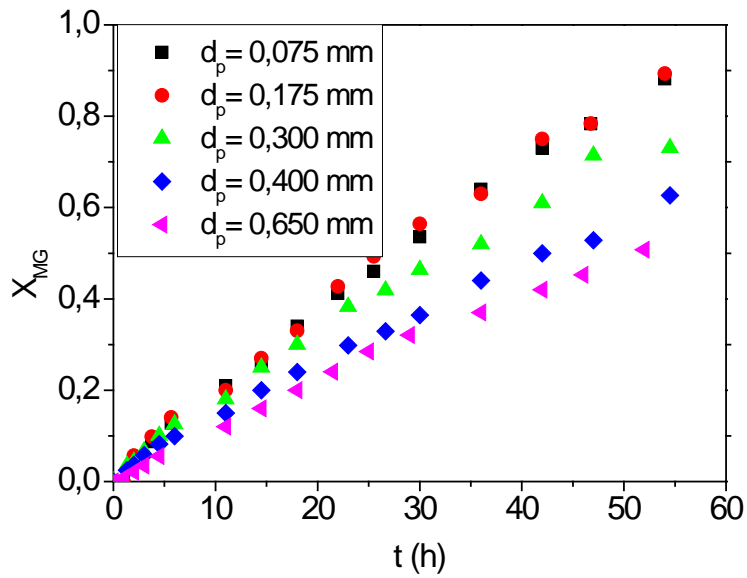


Figura 6.6. Variación de la conversión de monoéster con el tiempo ($C_{M,0}=20\text{g/L}$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$; Glicerina pura). Efecto del tamaño de partícula de Novozym®435.

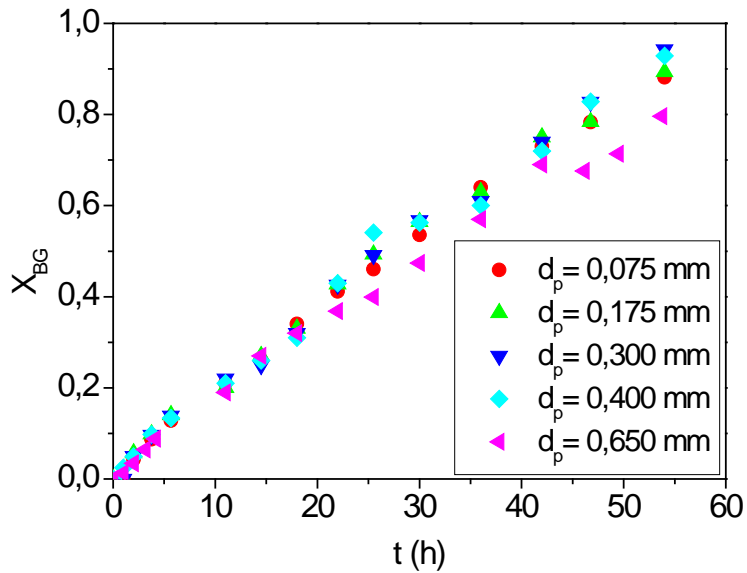


Figura 6.7. Variación de la conversión de monoéster con el tiempo ($C_{M,0}=20\text{g/L}$; $T=60^\circ\text{C}$; $C_E=30\text{g/L}$; $C_W=30\%$ w/w). Efecto del tamaño de partícula de Novozym®435.

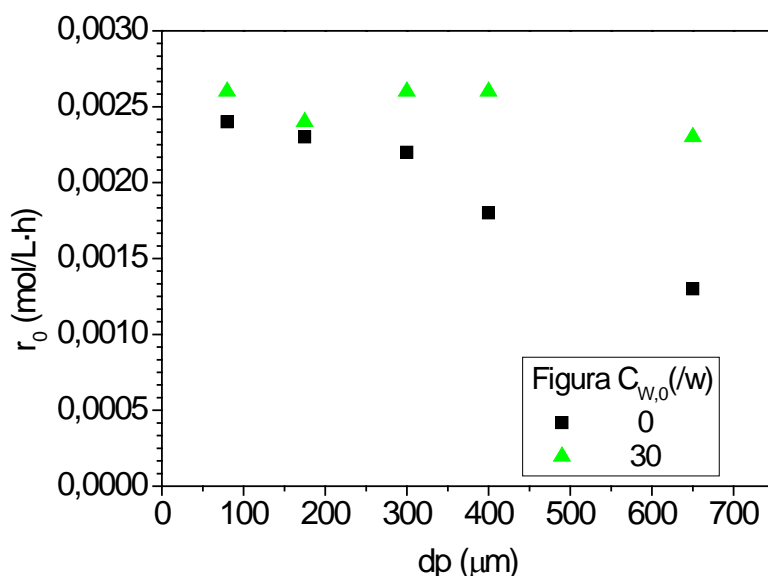


Figura 6.8. Velocidad inicial de reacción de esterificación de ácido metoxicinámico y glicerina catalizada por Novozym®435 en glicerina pura y glicerina 30% w/w H₂O.

6.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS CINÉTICOS

Se han realizado una serie de experimentos para estudiar la cinética de la producción de MG. Se han tenido en cuenta los resultados de los experimentos previos, atendiendo a las limitaciones prácticas de trabajo en cuanto a la concentración inicial de ácido p-metoxicinámico que se ve muy limitada debido a la solubilidad de este ácido en la glicerina. Además, se estudia también el sistema operando en un medio con un 30% w/w de agua, condiciones que restringen aún más el intervalo de concentraciones a considerar. Debido a esto, tanto para el medio glicerina pura como para la mezcla de glicerina con agua se trabaja en valores de concentración de 20g/L, muy cercano al valor límite de solubilidad a 50°C, el límite inferior del rango de temperaturas considerado (50°C-70°C).

Además, también debido al factor limitante que es la solubilidad, se realiza un único experimento a una mayor concentración de 40 g/L y a la temperatura central del intervalo (60°C), lo que es considerado, en principio, suficiente para comprobar las tendencias y conclusiones que se extraigan.

Las condiciones de los experimentos realizados se recogen en la Tabla 6.2. Sus resultados en forma de valores de concentración de MG frente al tiempo, determinadas por cromatografía según se explica en el Capítulo 2 de este trabajo, se presentan a continuación (Tabla 6.4 a 6.6).

Tabla 6.2. Condiciones de operación de experimentos esterificación de ácido p-metoxicinámico con glicerina catalizada por Novozym®435 (N=250 rpm; C_E=30 g/L)

Experimento	T (°C)	C _{B,0} (g/L)	C _{W,0} (% w/w)
M1	50	20	0
M2	60	20	0
M3	70	20	0
M4	60	40	0
M5	50	20	30
M6	60	20	30
M7	70	20	30
M8	60	40	30

Tabla 6.3. Resultados de los experimentos M1 y M2 (Glicerina pura)

M1	20 g/L; 50°C; Glicerina pura		M2	20 g/L; 60°C; Glicerina pura		
	t (h)	C _{MG} (M)		X _{MG}	t (h)	C _{MG} (M)
	0	0	0	0	0	
	1	2,9·10 ⁻⁴	2,6·10 ⁻³	1	8,4·10 ⁻⁴	7,6·10 ⁻³
	2	9,2·10 ⁻⁴	8,1·10 ⁻³	2	2,4·10 ⁻³	0,021
	3	1,5·10 ⁻³	0,013	3	3,9·10 ⁻³	0,035
	4,5	2,7·10 ⁻³	0,023	4,5	6,2·10 ⁻³	0,056
	11	6,0·10 ⁻³	0,053	11	0,014	0,126
	14,5	9,0·10 ⁻³	0,079	14,5	0,018	0,162
	18	0,011	0,096	18	0,022	0,198
	21,5	0,013	0,115	21,5	0,027	0,240
	25	0,015	0,127	25	0,032	0,285
	29	0,017	0,149	29	0,036	0,321
	36	0,019	0,167	36	0,042	0,378
	42	0,021	0,184	42	0,047	0,423
	46	0,023	0,207	46	0,050	0,453
	52	0,026	0,231	52	0,057	0,509

Tabla 6.4. Resultados de los experimentos M3 y M4 (Glicerina pura)

M3	20 g/L; 70°C; Glicerina pura		M4	40 g/L; 60°C; Glicerina pura	
t (h)	C_{MG}(M)	X_{MG}	t (h)	C_{MG}(M)	X_{MG}
0	0	0	0	0	0
1	2,5·10 ⁻³	0,023	1	8,7·10 ⁻⁴	3,9·10 ⁻³
2	5,6·10 ⁻³	0,051	2	2,5·10 ⁻³	0,011
3	8,6·10 ⁻³	0,078	3	4,1·10 ⁻³	0,018
4,5	0,013	0,115	4,5	5,9·10 ⁻³	0,026
11	0,028	0,252	11	0,015	0,067
14,5	0,038	0,342	14,5	0,019	0,084
18	0,045	0,405	18	0,024	0,104
21,5	0,052	0,465	21,5	0,028	0,125
25	0,060	0,545	25	0,032	0,143
29	0,068	0,612	29	0,037	0,166
36	0,078	0,703	36	0,044	0,196
42	0,087	0,786	42	0,049	0,218
46	0,087	0,788	46	0,054	0,238
52	0,096	0,862	52	0,061	0,272

Tabla 6.5. Resultados de los experimentos M5 y M6 (30%w/w H₂O)

M5	20 g/L; 50°C; 30%w/w H ₂ O		M6	20 g/L; 60°C; 30%w/w H ₂ O		
	t (h)	C _{MG} (M)		X _{MG}	t (h)	C _{MG} (M)
	0	0	0	0	0	
	1	5,8·10 ⁻⁴	5,1·10 ⁻³	1	1,4·10 ⁻³	0,012
	2	1,1·10 ⁻³	9,8·10 ⁻³	2	3,6·10 ⁻³	0,033
	3,166	2,2·10 ⁻³	0,019	3,166	6,8·10 ⁻³	0,062
	4,166	3,2·10 ⁻³	0,028	4,166	9,3·10 ⁻³	0,084
	5	4,1·10 ⁻³	0,036	5	0,011	0,103
	11	7,0·10 ⁻³	0,061	11	0,016	0,144
	14,5	0,010	0,088	14,5	0,024	0,216
	18	0,013	0,114	18	0,029	0,261
	24,33	0,019	0,170	24,33	0,041	0,371
	29,33	0,023	0,199	29,33	0,050	0,451
	36	0,025	0,219	36	0,060	0,541
	42	0,029	0,254	42	0,064	0,577
	46,16	0,032	0,280	46,16	0,071	0,644
	49,5	0,033	0,291	49,5	0,075	0,679

Tabla 6.6. Resultados de los experimentos M7 y M8 (30%w/w H₂O)

M7	20 g/L; 70°C; 30%w/w H ₂ O		M8	40 g/L; 60°C; 30%w/w H ₂ O		
	t (h)	C _{MG} (M)		X _{MG}	t (h)	C _{MG} (M)
	0	0	0	0	0	
	1	4,3·10 ⁻³	0,038	1	1,2·10 ⁻³	0,011
	2	0,010	0,090	2	4,1·10 ⁻³	0,018
	3,166	0,016	0,148	3,166	7,3·10 ⁻³	0,033
	4,166	0,021	0,188	4,166	0,010	0,047
	5	0,024	0,214	5	0,013	0,056
	11	0,040	0,360	11	0,015	0,067
	14,5	0,050	0,450	14,5	0,020	0,089
	18	0,060	0,541	18	0,030	0,133
	24,33	0,084	0,757	24,33	0,044	0,194
	29,33	0,094	0,844	29,33	0,054	0,238
	36	0,095	0,856	36	0,060	0,267
	42	0,100	0,901	42	0,070	0,311
	46,16	0,100	0,898	46,16	0,073	0,326
	49,5	0,100	0,866	49,5	0,076	0,337

6.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos para los experimentos M1 a M8 se han utilizado para determinar el modelo cinético que se ajuste apropiadamente a ellos y que sea capaz, por tanto, de explicar la fenomenología de la esterificación de ácido p-metoxicinámico con glicerina utilizando Novozym®435 como catalizador y en medios libres de disolventes orgánicos. En este estudio se ha dado un tratamiento análogo, pero separado, a los experimentos donde el medio es glicerina pura y a aquellos donde el medio es una mezcla de glicerina con un 30% w/w en agua.

6.3.1. Determinación del modelo cinético

En los Capítulos 4 y 5 se ha estudiado la cinética de la esterificación de ácido benzoico con glicerina catalizada por Novozym® 435 y en base a ellos, se ha planteado el siguiente modelo de reacción, que, en principio, ha de ser válido para la producción del monoéster en medio glicerina y 30%w/w H₂O.

El modelo generalmente aceptado para una esterificación catalizada por lipasas se basa en el mecanismo Ping-pong Bi-bi (Leszczak y col., 1998; Hari Krishna y col., 2001; Yadav y col., 2008; Sun y col., 2009). Uno de los reactivos, el glicerol, se encuentra en un exceso muy grande, de forma que esta expresión se simplifica a una hiperbólica, de tipo Michaelis-Menten, como la Ecuación 6.2:

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B} \quad [6.2]$$

Si el segundo reactivo, el ácido, se encuentra en condiciones de sobresaturación, esto es, por encima de su punto de solubilidad, y si la velocidad de la disolución del ácido, aún en estado sólido en el medio, a medida que éste se va consumiendo como consecuencia de la reacción, se puede considerar lo

suficientemente elevada, para que la etapa química sea la limitante, la concentración de ácido en disolución se puede considerar constante e igual al punto de solubilidad en esas condiciones, $C_{M,S}$, de manera que la Ecuación 6.2 resulte en una expresión como la Ecuación 6.3. Este modelo corresponde, de hecho, a un modelo de orden cero que evoluciona hacia un modelo hiperbólico simple tipo Michaelis-Menten.

$$\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_{M,S}}{K + C_{M,S}} \quad [6.3]$$

Así, si se trabaja en discontinuo y en condiciones de sobresaturación, la producción del mono-p-metoxicinamato de glicerina se puede describir como un proceso en dos etapas consecutivas:

1. Condiciones de sobresaturación en ácido (Ecuación 6.3)
2. Condiciones de disolución homogénea de ácido (Ecuación 6.2)

Este es el modelo cinético probado para la síntesis de MG en glicerina pura y en mezcla con agua. Aplicando el método integral, en primer lugar se han realizado los ajustes experimento a experimento, donde se ha podido comprobar el sentido físico de los parámetros propuestos, para, posteriormente, realizar el ajuste simultáneo de todos los experimentos. Una de las restricciones, que al mismo tiempo se utiliza como un criterio físico para la discriminación de modelos, es la ecuación de Arrhenius (Ecuación 3.4), que explica la evolución de una constante cinética con la temperatura. El ajuste no lineal se realiza aplicando mínimos cuadrados, tal como se explica en el Capítulo 2 de este trabajo.

Los resultados de los parámetros cinéticos así determinados se presentan en las Tablas 6.7 y 6.8, para la producción de MG en glicerina pura y en una mezcla 30% w/w agua, respectivamente. Como puede comprobarse, el ajuste es muy correcto. Los errores que acompañan los diferentes parámetros son menores al valor del propio parámetro, y los parámetros estadísticos tienen

valores muy buenos, más teniendo en cuenta el reducido número de experimentos realizados para la obtención del modelo cinético.

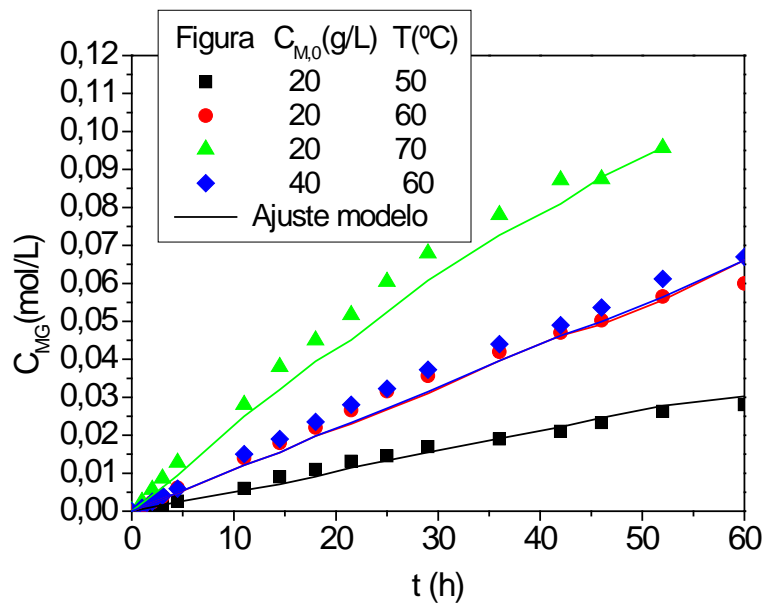
La bondad del ajuste es evidente, también, si se analizan las gráficas de los datos experimentales junto a la predicción del modelo cinético (Figura 6.9 y 6.10 para la reacción en glicerina pura y en agua, respectivamente) y también las de análisis de residuos (Figura 6.11y 6.12). La magnitud del error, que en general se puede considerar muy aceptable, es algo mayor a tiempos más cortos, lo que se explica, una vez más, en que a estos tiempos la concentración de MG es aún pequeña de forma que los residuos en valor relativo pueden ser considerables aunque en términos absolutos no lo sean tanto.

Tabla 6.7. Modelo cinético propuesto para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido metoxicinámico y glicerina catalizada por Novozym®435 en medio Glicerina pura.

$\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_{M,S}}{K + C_{M,S}}; \text{ Con } k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_{a,k}}{RT}}$ $\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_M}{K + C_M}$				
Parámetro	Valor ± error	SQR	F95	AICc
Ea k (J/mol)	2,57·10 ⁴ ± 3,67·10 ³			
lnk ₀	1,50 ± 1,32	1,13·10 ⁻³	1,23·10 ³	-4,7·10 ²
K (M)	2,81·10 ⁻¹ ± 2,0·10 ⁻³			

Tabla 6.8. Modelo cinético propuesto para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido metoxicinámico y glicerina catalizada por Novozym®435 en medio 30% w/w H₂O .

$\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_{M,S}}{K + C_{M,S}}; \text{ Con } k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_{a,k}}{RT}}$ $\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_M}{K + C_M}$				
Parámetro	Valor ± error	SQR	F ₉₅	AICc
E _{a,k} (J/mol)	3,82·10 ⁴ ± 3,21·10 ³	7,70·10 ⁻⁴	4,31·10 ³	-5,2·10 ²
lnk ₀	6,80 ± 1,16			
K (M)	2,81·10 ⁻¹ ± 4,36·10 ⁻³			



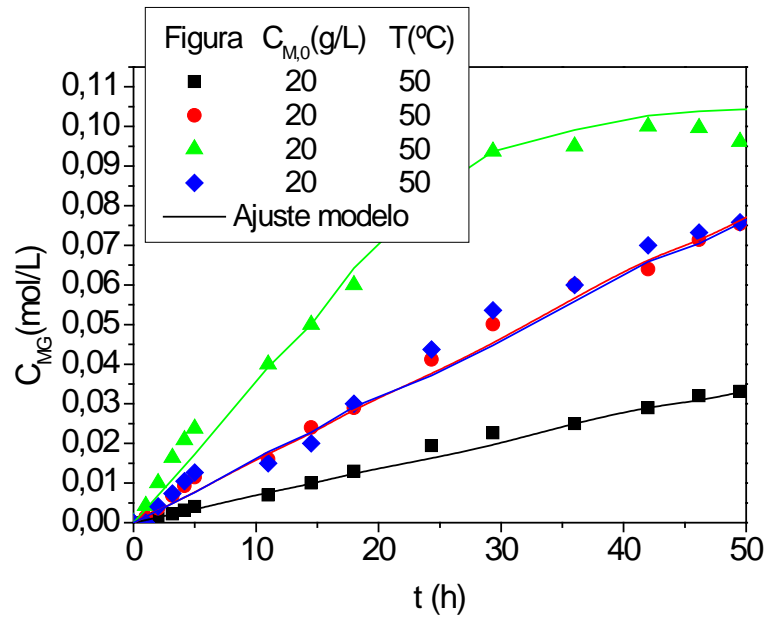


Figura 6.10. Ajuste a modelo cinético. Experimentos con Novozym(R)435 en Glicerina 30% w/w H₂O

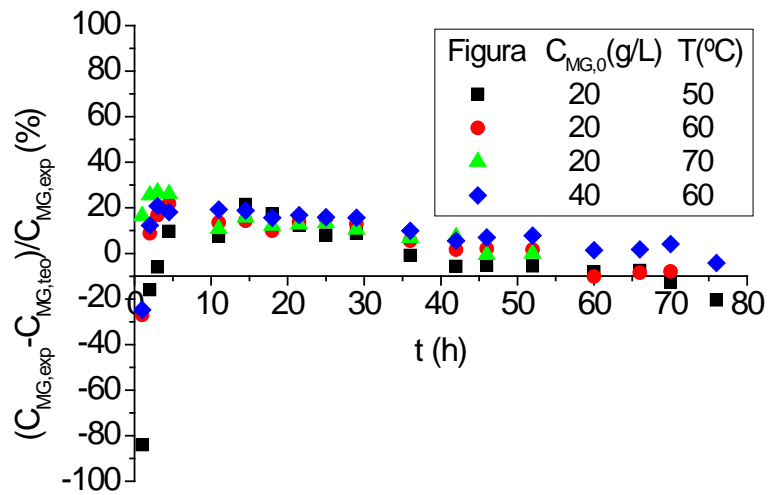


Figura 6.11. Análisis de residuos de ajuste modelo cinético. Experimentos en Glicerina pura.

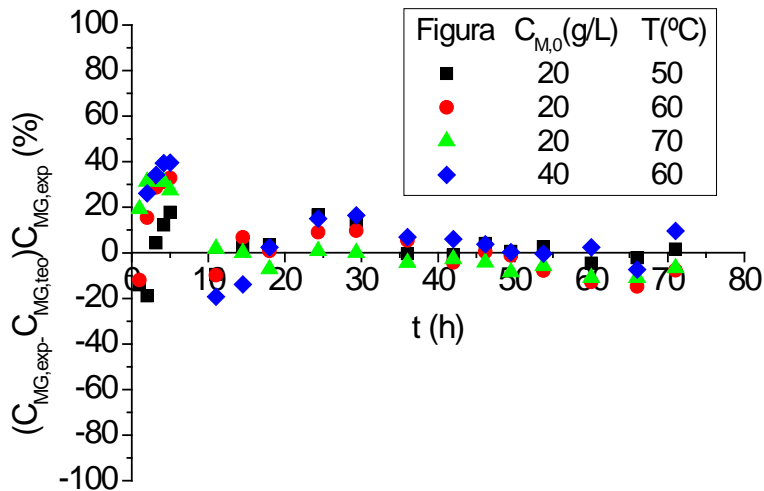


Figura 6.12. Análisis de residuos de ajuste modelo cinético. Experimentos en Glicerina 30% w/w H₂O.

Si se relacionan los valores de las energías de activación de la reacción en glicerina y en la mezcla 30% w/w agua, se obtiene:

$$\frac{[E_{a,k}]_{G,pura}}{[E_{a,k}]_{G,30\%H_2O}} = \frac{2,57 \cdot 10^4}{3,82 \cdot 10^4} = 0,7$$

Este valor es algo superior al esperado de 0,5 descrito en la bibliografía cuando las limitaciones al transporte interno son muy grandes. Esto se debe, posiblemente, a que, como se ha comprobado al realizar los experimentos previos, la velocidad propia de la etapa química es bastante inferior al caso de la esterificación con ácido benzoico, de manera que las limitaciones al transporte en el interior de la partícula de Novozym®435 son comparativamente menos importantes.

También se ha podido observar la poca variación del parámetro K con la temperatura, debido, seguramente a la importancia que tiene el exceso de glicerol entre los parámetros que incluye esta constante. Este fenómeno se pudo

observar de igual manera al trabajar con ácido benzoico. Si se comparan los valores determinados para la esterificación con ambos ácidos se obtiene:

$$\frac{[K]_B}{[K]_M} = \frac{0,49}{0,28} = 1,8$$

Esta constante, ya que incluye la constante de Michaelis, indica el grado de interacción de la enzima con el sustrato, en este caso, el ácido. Un menor valor de $K_{M,\text{ácido}}$ indica una mayor afinidad de la enzima por el sustrato en cuestión, es decir, que la lipasa CALBL tiene una menor afinidad por el ácido benzoico comparado con el p-metoxicinámico.

6.4. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO

El interés del ácido p-metoxicinámico radica, fundamentalmente, en su capacidad para oxidarse y mantener su estabilidad, debido a la posibilidad de formar múltiples estructuras resonantes, debido a la presencia de dobles enlaces conjugados. Estas propiedades convierten a este ácido en un buen filtro UV, ya que será capaz de captar esta radiación y absorberla, impidiendo la oxidación de las especies que le rodean y a las que cumple la función de proteger. Así mismo, como también se ha comentado, para que este filtro UV pueda ser aplicado en la industria cosmética, en cremas solares, por ejemplo, es necesario que, además de su actividad como filtro, disponga de unas propiedades determinadas para que se le pueda dar un uso óptimo, también desde el punto de vista de la salud del usuario. Teniendo esto en cuenta, hay que prestar especial atención a la hidrofiliidad del filtro, ya que hay que mantener un cuidadoso balance entre la hidrofobia e hidrofilia necesarias para que el compuesto se mantenga distribuido en la piel, sin perderse por efecto de la sudoración o el baño, por ejemplo, pero que no sea demasiado lipofílico para que penetre al interior de la piel y se distribuya por el organismo pudiendo generar problemas de salud, además de

perder su eficacia como filtro ultravioleta por no estar ya sobre la piel (Nohynek y col., 2001; Holser y col., 2008).

Atendiendo a estos criterios, en este apartado se analizan las propiedades clave para la utilidad del monoéster de glicerol y p-metoxicinámico:

- Hidrofilicidad/ hidrofobicidad.
- Actividad de filtro UV (SPF).
- Fotoestabilidad.

Como referencia se analiza también el octilmetoxicinamato, OMC, el filtro UV de uso más común en la composición de cremas solares basado en el ácido p-metoxicinámico.

6.4.1. Hidrofilicidad/ Hidrofobicidad

Como se ha comentado ya, la polaridad del producto resultante es una propiedad de importancia para su aplicación en la industria cosmética, ya que determina, por un lado, la viabilidad de su utilización en la emulsión que conforma la crema y, por otro lado, determina también la idoneidad de su uso al ser más inocuo para la salud del usuario al controlar mejor su penetrabilidad en la piel, algo que debe ser evitable en la medida de lo posible.

Para estudiar la polaridad del MG se ha aplicado el método cromatográfico o CLAR (OECD, 2004), descrito en el apartado 2.3.4.3 de este trabajo. Este método consiste en la medida de los tiempos de retención en HPLC (columna C₁₈) de una serie de compuestos de referencia, con coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P_{OW}$) conocidos, que se utilizan para obtener una recta de calibrado. Al analizar el compuesto problema se aplica la ecuación del calibrado (Figura 2.12) y, conocido el tiempo de retención se puede determinar $\log P_{OW}$. Los resultados de estos análisis se presentan en la Figura 6.13. En ella se puede comprobar como, por un lado, tanto el ácido p-metoxicinámico como su monoglicérido tienen un coeficiente de reparto octanol/agua muy inferior al compuesto de referencia. La naturaleza del alcohol resulta determinante en este aspecto. La utilización de octanol (apolar) o glicerol (polar) para esterificar el

ácido metoxicinámico significa un cambio en algo más de cuatro órdenes de magnitud. Es evidente que el MG ha de penetrar menos en la piel, incluso menos que el propio ácido. Los valores numéricos determinados en este ensayo, se recogen en la Tabla 6.9. Son resultados con mucha corrección, muy cercanos a la tendencia observada en la recta de calibrado, y muy cercanos además a los valores descritos en la bibliografía, donde $\log P_{ow}$ es igual a 6 y 1,8 para OMC (Straub, 2002) y ácido metoxicinámico (Human Metabolome project., 2012), respectivamente.

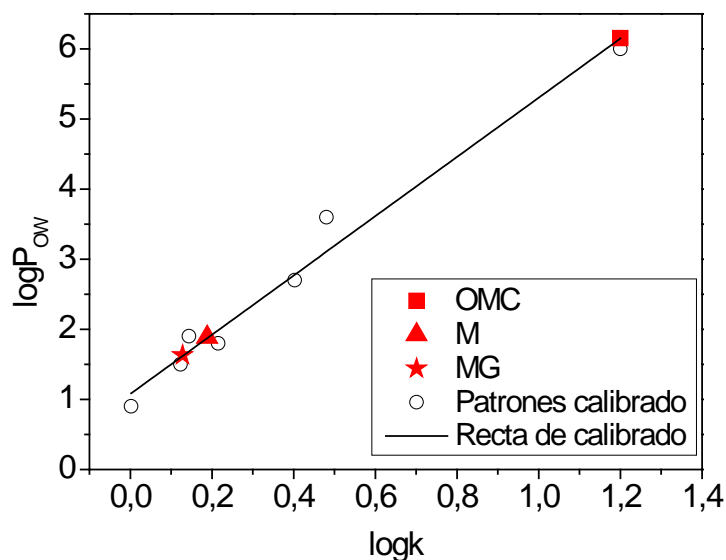


Figura 6.13. Determinación del coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P_{ow}$) de ácido metoxicinámico (M), su monoglicérido (MG) y compuesto de referencia OMC.

Tabla 6.9. Resultados coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P_{ow}$)

Compuesto	Log P_{ow}
OMC	6,15
M	1,89
MG	1,63

6.4.2. Actividad filtro UV (SPF)

La capacidad de las moléculas del ácido p-metoxicinámico y, por lo tanto también, de su monoglicérido, para absorber energía en el rango de longitudes de onda del ultravioleta, le confieren a este compuesto sus propiedades como filtro de radiación. Como primer paso para evaluar esta propiedad se ha realizado un barrido de absorción de una disolución de MG en un espectrofotómetro, obteniendo el espectro que se muestra en la Figura 6.14. Se puede observar que tanto el OMC como el MG absorben ambos en el rango de longitudes de onda correspondientes al UV-B (280-315 nm) y abarcan una parte del intervalo de longitudes de onda correspondientes al espectro del UV-A (315-400nm). De aquí se deduce la utilidad de la utilización de estos compuestos como filtros UV.

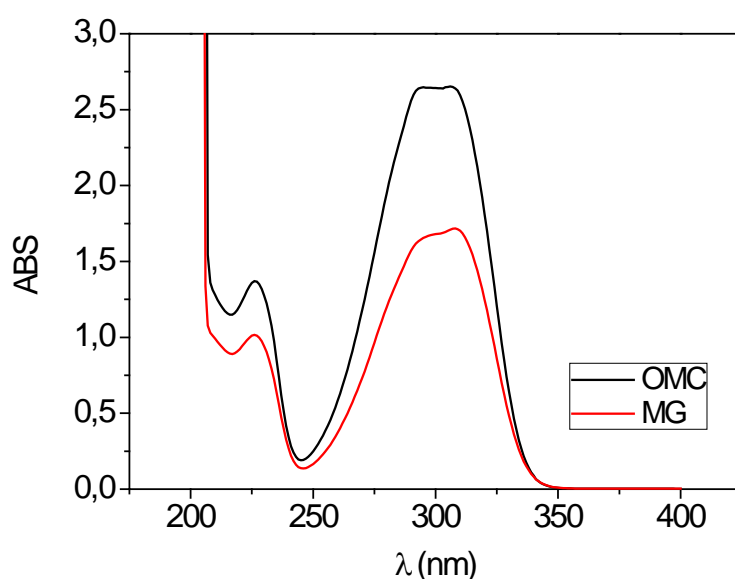


Figura 6.14. Espectros medidos de absorción MG y OMC

Para la cuantificación de la actividad de un compuesto o una preparación cosmética/ farmacéutica se ha adoptado convencionalmente el parámetro denominado factor de protección solar o SPF, que se define como el coeficiente de la relación que existe entre el tiempo mínimo de aparición de un eritema,

dosis eritematógica mínima (DEM) en una piel protegida con un filtro solar y la DEM en una piel no protegida.

Como se explica en el apartado 2.3.4.1 de este trabajo, en el cálculo de este parámetro se tienen en consideración múltiples factores, entre ellos la intensidad de la radiación incidente y la longitud de onda de la radiación. Siguiendo la expresión de Diffey y Robson (Diffey y col., 1989), el valor del SPF se puede determinar mediante la ecuación [6.4]

$$SPF = \frac{\sum_{(400-290)} E_{\lambda} \cdot B_{\lambda}}{\sum_{(400-290)} \frac{E_{\lambda} \cdot B_{\lambda}}{MPF_{\lambda}}} \quad [6.4]$$

donde E_{λ} corresponde al espectro de irradiación solar sobre la tierra en unas condiciones determinadas (mediodía, media estación a 40°N, 20° del cenit solar); B_{λ} es la eficacia, para cada longitud de onda, de provocar daños en la piel (eficacia eritematológica) y MPF_{λ} para cada longitud de onda seleccionada, corresponde a la relación de señal de referencia (sustrato sin muestra) con la señal de muestra (sustrato con muestra).

Se aplica un método de medida “in vitro” utilizando el espectrofotómetro, muy cercano a algunos métodos estandarizados como ISO 24443: 2012 y aceptados por la Asociación Europea de Cosméticos (COLIPA), tal como se ha explicado en el Capítulo 2 de este trabajo, y se obtienen los valores que se presentan en la Tabla 6.10. Los resultados del monoglicérido de metoxicinámico son comparables a los del compuesto de referencia, de manera que parece bastante viable su utilización en cremas solares en sustitución del OMC, teniendo en cuenta, además, sus mejores propiedades en términos de hidrofiliidad.

Tabla 6.10. Resultados de la medida “in vitro” del SPF.

Compuesto	SPF
OMC	11,16 ± 0,38
M	12,30 ± 0,26
MG	11,92 ± 0,59

6.4.3. Fotoestabilidad

Finalmente, se evalúa la estabilidad del filtro UV sometido a radiación solar simulada ya que es también importante conocer, aparte de su actividad, el grado de degradación que puede ir sufriendo este compuesto a medida que se prolonga su exposición a la radiación y que puede ser un factor clave para su aplicación final, en cremas solares, por ejemplo (Tarras-Wahlberg y col., 1999; Couteau y col., 2007). Para este estudio se ha utilizado un simulador solar, como se describe en el apartado 2.3.4.2 de este trabajo (Gonzalez y col., 2007; Hojerová y col., 2011). Se preparan muestras que se van recogiendo a lo largo del tiempo para proceder a su medida del SPF. Como medida de la fotoestabilidad, se ha definido el tiempo de vida medio, como en la expresión siguiente:

$$t_{50} = [t]_{\text{SPF}=\frac{\text{SPF}_0}{2}} \quad [6.5]$$

La Figura 6.15 es una representación gráfica del efecto de la radiación solar simulada sobre la actividad medida del filtro ultravioleta (SPF). Si se tiene en cuenta la potencia de radiación solar se puede obtener también obtener una evolución de valores de SPF en función de la energía total irradiada sobre una muestra. Estos valores se recogen en la Figura 6.16.

Puede observarse la mayor estabilidad del MG frente a OMC, ya que la velocidad a la que se degrada es bastante inferior. Esto se traduce en una mayor vida útil como filtro de radiación UV, como se puede comprobar al observar los valores calculados de tiempo de vida media de los compuestos estudiados (Tabla 6.11), donde el t_{50} del MG es hasta 4 veces mayor que el del OMC.

La mayor fotoestabilidad del monoglicérido del p-metoxicinámico, así como su mayor hidrofiliicidad en comparación al compuesto de referencia, permiten pensar en la viabilidad de la aplicación del mono-p-metoxicinamato de glicerol como filtro UV en cremas solares.

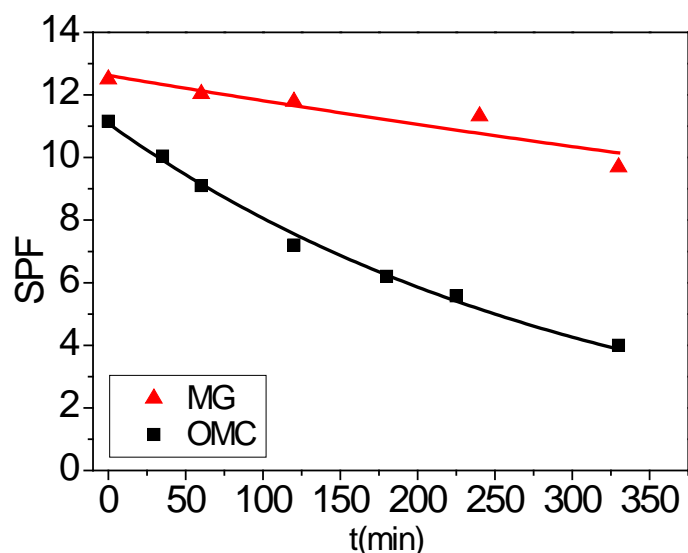


Figura 6.15. Evolución de la actividad del filtro UV con el tiempo. Ensayo de fotodegradación con radiación solar simulada.

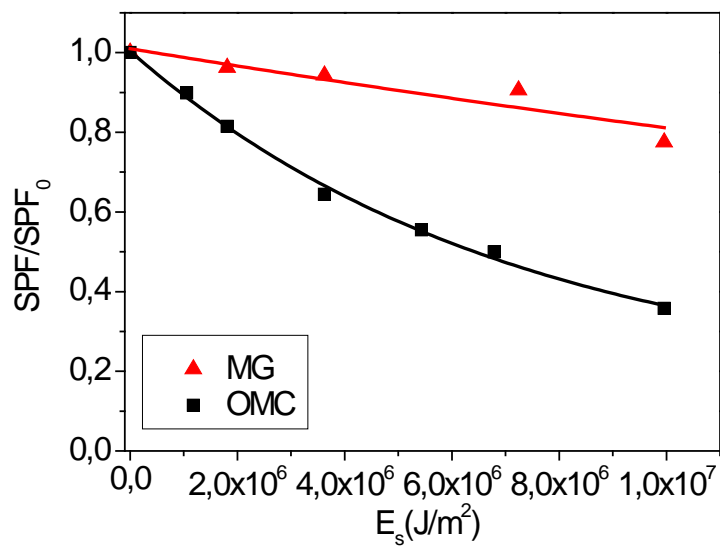


Figura 6.16. Evolución de la actividad del filtro UV con la energía recibida. Ensayo de fotodegradación con radiación solar simulada.

Tabla 6.11. Tiempo de vida media de filtros UV. Ensayo de fotodegradación

Compuesto	t_{50} (h)
OMC	3,6
MG	16,9

6.5. BIBLIOGRAFÍA

Aleksey, B. y A. Gross (1994). "Production of Monoglycerides by enzymatic transesterification", Opta Food Ingredientents, Inc. **5,316,927**.

Couteau, C.; A. Faure; J. Fortin; E. Papis y L. J. M. Coiffard (2007). "Study of the photostability of 18 sunscreens in creams by measuring the SPF in vitro." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44**(1): 270-273.

Diffey, B. L. y J. Robson (1989). "A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **40**: 127-133.

Gonzalez, H.; N. Tarras-Wahlberg; B. Stromdahl; A. Juzeniene; J. Moan; O. Larko; A. Rosen y A.-M. Wennberg (2007). "Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps." *BMC Dermatology* **7**(1): 1.

Hari Krishna, S. y N. G. Karanth (2001). "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547**(2): 262-267.

Hojerová, J.; A. Medovčíková y M. Mikula (2011). "Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight." *International Journal of Pharmaceutics* **408**(1-2): 27-38.

Holser, R.; T. Mitchell; R. Harry-O'kuru; S. Vaughn; E. Walter y D. Himmelsbach (2008). "Preparation and Characterization of 4-Methoxy Cinnamoyl Glycerol." *Journal of the American Oil Chemists Society* **85**(4): 347-351.

Human Metabolome project. (2012). "Human Metabolome Database." Retrieved 05/04/2012, 2012, from <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB02040>.

Kobayashi, T.; T. Matsuo; Y. Kimura y S. Adachi (2008). "Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**(11): 1041-1044.

Leszczak, J.-P. y C. Tran-Minh (1998). "Synthesis of benzoates by enzymatic catalysis in heterogeneous medium." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5**(1-4): 277-281.

Molinero, L.; M. Ladero; J. J. Tamayo; J. Esteban y F. García-Ochoa (2013). "Thermal esterification of cinnamic and p-methoxycinnamic acids with glycerol to cinnamate glycerides in solventless media: A kinetic model." *Chemical Engineering Journal* **225**(0): 710-719.

Nohynek, G. J. y H. Schaefer (2001). "Benefit and Risk of Organic Ultraviolet Filters." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **33**(3): 285-299.

OECD (2004). "Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method", OECD Publishing.

- Orjuela, A.; A. J. Yanez; A. Santhanakrishnan; C. T. Lira y D. J. Miller (2012). "Kinetics of mixed succinic acid/acetic acid esterification with Amberlyst 70 ion exchange resin as catalyst." *Chemical Engineering Journal*(0).
- Pagliari, M. y M. Rossi (2008). "The future of glycerol." *Focus on Catalysts* **2008**(6): 8-8.
- Saha, B. y M. Mohan Sharma (1996). "Esterification of formic acid, acrylic acid and methacrylic acid with cyclohexene in batch and distillation column reactors: ion-exchange resins as catalysts." *Reactive and Functional Polymers* **28**(3): 263-278.
- Straub, J. O. (2002). "Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data." *Toxicology Letters* **131**(1-2): 29-37.
- Sun, S.; L. Shan; Y. Liu; Q. Jin; Y. Song y X. Wang (2009). "Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57**(1-4): 104-108.
- Tarras-Wahlberg, N.; G. Stenhagen; O. Larko; A. Rosen; A. M. Wennberg y O. Wennerstrom (1999). "Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation." *J Invest Dermatol* **113**: 547 - 553.
- Thengumpillil (2001). "Process for the preparation of a monoglyceride". US.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2008). "Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**(17): 7915-7922.
- Yadav, G. D. y M. B. Thathagar (2002). "Esterification of maleic acid with ethanol over cation-exchange resin catalysts." *Reactive and Functional Polymers* **52**(2): 99-110.

7.- Resumen y Conclusiones

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

7.1 RESUMEN

La glicerina es un polialcohol con múltiples aplicaciones. Se encuentra en abundancia en la naturaleza formando parte de moléculas más complejas como triglicéridos (grasas y aceites) o fosfolípidos. Su interés industrial es grande por su versatilidad ya que, debido a sus propiedades físicas y químicas, puede interaccionar con compuestos apolares y polares. Por ello, es de uso muy común en industrias como la farmacéutica o alimentaria. En la última década se ha disparado su disponibilidad debido a la creciente producción de biodiesel, ya que constituye un 10% en peso respecto a este biocombustible. Su precio ha ido descendiendo en consecuencia, a la vez que ha aumentado su interés como posible reactivo para procesos industriales.

Existen múltiples posibilidades como reactivo para el aprovechamiento del glicerol, incluyendo su esterificación con ácidos orgánicos de distintos tipos. Los ésteres son compuestos muy utilizados en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, en aplicaciones diversas ya sea como especie activa o como aditivo (surfactantes, emulsionantes), aunque también en industrias como la de polímeros, entre otras.

La reacción de esterificación puede tener lugar en ausencia de catalizador a elevadas temperaturas, obteniéndose una mezcla de ésteres (monoglicéridos, diglicéridos y triglicérido) y agua; cabe incluso la posibilidad de que se produzcan poliglicéridos. Por otro lado, el uso de un catalizador, generalmente de tipo ácido, permite moderar las condiciones en las que tiene lugar el proceso de esterificación y, además, mejorar la selectividad hacia los productos obtenidos. En estos dos aspectos, los biocatalizadores son especialmente interesantes. Las enzimas son capaces de catalizar la reacción de esterificación permitiendo que se pueda producir en condiciones muy cercanas a las ambientales, consiguiendo una selectividad casi total a monoglicérido.

Algunas enzimas tienen una elevada especificidad espacial, es decir, que son específicas de algún estereoisómero y/o enantiómero, una propiedad muy interesante para la industria farmacéutica.

Este trabajo se ha centrado en la esterificación de glicerina con dos ácidos de tipo fenólico, el ácido benzoico y el p-metoxicinámico. Esta reacción puede ser catalizada por una lipasa, la lipasa B de *Candida antarctica*, tanto en estado libre como inmovilizada (Novozym® 435), con el objetivo de obtener el monoéster extremo de la glicerina. Se han elegido estos dos ácidos como ejemplos de productos de aplicación diversa. El monoglicérido extremo del ácido benzoico se utiliza como plastificante o en la industria farmacéutica para la síntesis de β -bloqueantes o factores activadores de plaquetas (PAFs), (S)-carnitina y ácido γ -amino-13-hidroxi-butírico (GABOB). El monoéster del ácido p-metoxicinámico se puede utilizar como ingrediente de productos cosméticos, como cremas solares, debido a sus propiedades como filtro ultravioleta, que manteniendo la fotoactividad del ácido de partida, mejora otras como la transdermicidad, frente a otros filtros utilizados en la industria, como el octilmetoxicinamato, OMC. Además, los procesos estudiados se llevan a cabo en ausencia de disolventes orgánicos, con las ventajas que esto conlleva en términos económicos y ambientales.

En primer lugar, se ha establecido un procedimiento de trabajo que ha permitido la realización de los distintos experimentos de forma reproducible. Estos se llevan a cabo de forma discontinua, en reactores agitados magnéticamente de 50 mL, operando a temperatura constante. Se ha dispuesto de un medidor, asociado a un control de temperatura (PID) que actúa sobre el baño termostático de glicerina en el que se sumerge el reactor. Las muestras recogidas a lo largo del experimento se depositan en un tubo Eppendorf que se introduce y mantiene en el congelador, para parar la reacción y evitar la oxidación.

Se han empleado diversas técnicas analíticas, en función del objetivo del análisis. Las muestras recogidas a lo largo de los experimentos de esterificación, se han sometido a un análisis por cromatografía líquida (HPLC) en fase reversa. Se ha utilizado una columna C-18 (Mediterránea Sea-18 de Teknokroma) a 50°C y como eluyente una mezcla isocrática 55/45 v/v de metanol y una solución

acuosa de ácido sulfúrico de pH 2,2, con un caudal de 0,8 mL/min. Los compuestos de la mezcla de reacción son separados en función de su polaridad y se cuantifican aplicando un calibrado lineal a la respuesta de absorbancia a longitud de onda de 254 nm del detector “diode-array” del que dispone el equipo. También se ha empleado la cromatografía para evaluar el grado de hidrofiliidad del monoglicérido del ácido p-metoxicinámico, inversamente proporcional a la transdermicidad, la cual se pretende reducir por medio de la esterificación con glicerina. En base al mismo principio, la polaridad determina el grado de interacción del compuesto con la fase estacionaria y se ha podido obtener un coeficiente de reparto octanol/agua aplicando un calibrado con especies para las que este parámetro es conocido. En este caso, se ha utilizado la columna C-18 a 35 °C, eluyendo con metanol:agua 3:1 v/v con un caudal de 1 mL/min.

Como medio para la identificación de los compuestos generados en el transcurso de los experimentos de esterificación, se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un Espectrómetro de Masas de trampa de iones Bruker modelo Esquire-LC. Además, la estructura química de los productos obtenidos en las reacciones de esterificación se ha comprobado por medio de Resonancia Magnética Nuclear (NMR).

Para medir la actividad enzimática de varias lipasas y para la evaluación de su desactivación, se ha utilizado un procedimiento sencillo: la reacción de hidrólisis de p-nitrofenilbutirato. Uno de los productos de esta reacción, el p-nitrofenol da una coloración amarillenta a la mezcla de reacción, catalizada por la lipasa, y se puede detectar por medio de la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 348 nm. Se ha utilizado un espectrofotómetro que permite el registro continuo de los datos de absorbancia del producto de una reacción que se lleva a cabo en la propia cubeta de medida, agitada magnéticamente y a 25 °C. Se dispone además de un software para el tratamiento de los datos recogidos y la determinación de una velocidad de reacción, que se ha relacionado con la actividad de la enzima objeto de análisis.

Para el estudio de la estructura de Novozym®435, el inmovilizado comercial de CALB, se han obtenido las isothermas BET con nitrógeno y se ha empleado la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Finalmente, las propiedades del monoglicérido de p-metoxicinámico se han determinado usando diferentes técnicas. La técnica de espectrofotometría de UV-vis se ha utilizado para medir el factor de protección solar (SPF). Esta técnica permite medir la absorbancia o transmitancia de los compuestos de interés en el rango de longitud de onda correspondiente a la radiación ultravioleta (200-400 nm). Para la medida *in vitro* del factor de protección solar (SPF, en inglés), se ha elegido un procedimiento desarrollado por la empresa Jasco Europe, en el que se utiliza un espectrofotómetro UV-vis de doble haz, en este trabajo se ha empleado el modelo Jasco V-630/SPF. Para determinar la fotodegradación *in vitro* de los monoglicéridos obtenidos, se ha utilizado, además, un simulador solar (lámpara HQI-R 250W) ubicado en las instalaciones del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) que reproduce, con la mayor exactitud posible, el espectro de radiación solar. Las muestras se han irradiado un máximo de 19 horas, tomando muestras cada hora, y analizando su factor de protección solar (SPF).

Con los procedimientos de trabajo perfectamente establecidos, se ha trabajado, en primer lugar, con el ácido benzoico y con la enzima en fase homogénea. En esta etapa se ha seleccionado el biocatalizador, de entre una serie de lipasas comerciales (lipasa B de *Candida antarctica* –CALB-L-, lipasa de *Candida rugosa* – AY30-, y lipasa de *Thermomyces lanuginosus* –TLL-), probando su actividad tanto con el test de hidrólisis como mediante la síntesis del monoglicérido de ácido benzoico. Entre ellas, la que mostró una mayor actividad en la síntesis de monoésteres, con gran diferencia, fue el preparado de Novozymes de la lipasa B de *Candida antactica* en suspensión (CALB-L).

Se han llevado a cabo, además, una serie de experimentos previos con el objetivo de estudiar la influencia de ciertas variables del proceso (solubilidad, temperatura, concentración de los reactivos, velocidad de agitación, inhibición y desactivación de la enzima). De esta forma, se ha acotado el campo experimental, de la siguiente forma, utilizando siempre una concentración de 3000mg/L de CALB-L, una temperatura de operación de 50 a 70 °C y una concentración inicial de ácido benzoico de 30 a 60 g/L.

Con los resultados experimentales, y siguiendo la catálisis de lipasas en la reacción de esterificación un mecanismo ping-pong bi-bi, se planteó un estudio

cinético, teniendo en cuenta que, simultáneamente a la reacción, la enzima se desactiva. Los modelos probados han sido los siguientes:

Modelo 1: Michaelis-Menten sin desactivación

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_{E0} \cdot C_B}{K + C_B}$$

Modelo 2: Michaelis-Menten con desactivación total

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_{d1} \cdot C_E - k_{d2} \cdot C_E \cdot C_B$$

Modelo 3: Michaelis-Menten con desactivación parcial

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$$

$$a_R = \frac{C_E + C_E \cdot \beta}{C_{E0}}$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_E^*}{dt} = -k_{d1} \cdot C_E - k_{d2} \cdot C_E \cdot C_B^b$$

Modelo 4: Michaelis-Menten con desactivación parcial en dos reacciones en serie

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$$

$$-\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_E'}{dt} + \frac{dC_E''}{dt}$$

$$\frac{dC_E'}{dt} = -k_{d1}' \cdot C_E - k_{d2}' \cdot C_E \cdot C_B^a$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_{d1} \cdot C_E - k_{d2} \cdot C_E \cdot C_B^b$$

El ajuste matemático de los diversos modelos cinéticos propuestos a los datos experimentales se ha realizado por medio de una regresión no lineal, según el algoritmo de Marquardt-Levenberg, a la que se ha acoplado una integración numérica basada en el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden, ambas implementadas en el software Aspen Custom Modeler v7.2. En una primera instancia, el ajuste se ha realizado experimento a experimento, a la temperatura y concentración de reactivos específica de cada uno de ellos, mediante regresión múltiple no lineal simple respuesta. Se ha evaluado su corrección por aplicación de criterios físicos y estadísticos (error en las constantes cinéticas, SRC, $F_{95\%}$, AICc), para proceder al ajuste multirespuesta, utilizando para cada modelo todos los datos experimentales de todos los experimentos a la vez. Para la elección del modelo que mejor representa los datos experimentales se han aplicado de nuevo los criterios de discriminación antes descritos, seleccionando finalmente un modelo tipo Michaelis-Menten irreversible y función de la concentración del ácido benzoico en el que, además, se considera la desactivación térmica y química de la enzima.

A continuación, se ha estudiado la aplicación de un catalizador heterogéneo en la reacción de esterificación de glicerina y ácido benzoico. Se han probado una serie de inmovilizados comerciales de lipasas, de forma análoga a sus homólogas libres: la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre resina – Novozym®435-, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre resina –TLIM- y la lipasa de *Rhizomucor miehei* inmovilizada por granulación –RMIM-, todas donadas por Novozymes. Entre ellas, como ocurría con las enzimas libres o en suspensión, la más activa fue el preparado de Novozymes de la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym®435).

También se ha evaluado la influencia de las variables de proceso en este sistema de reacción, prestando atención sobre todo a los fenómenos de transporte de materia, ya que se trata de una reacción con un catalizador heterogéneo. Además del estudio del efecto de la temperatura y de la concentración de ácido, se caracteriza la estabilidad de la enzima inmovilizada y

el efecto de la velocidad de agitación y del tamaño de partícula sobre la velocidad global del proceso.

Una vez se ha seleccionado el inmovilizado comercial de CALB (Novozym®435) y las condiciones de agitación en las que no influye la velocidad de la difusión externa, se ha estudiado la cinética de la reacción de esterificación variando la concentración de ácido benzoico entre 30 y 60 g/L y la temperatura de reacción entre 50 y 70 °C, a una concentración de 30 g/L de catalizador. Con los datos experimentales de la evolución de concentración de las especies a lo largo del tiempo, se han probado dos modelos cinéticos, representativos de los fenómenos que gobiernan el proceso, que son la etapa química y el transporte interno, ya que se observó que la desactivación enzimática era un fenómeno inexistente en las condiciones de operación estudiadas.

Modelo 1: Hiperbólico, tipo Michaelis-Menten

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$$

Modelo 2: Orden 1

$$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = k \cdot C_E \cdot C_B$$

Se ha realizado el ajuste a los datos experimentales como se ha explicado anteriormente y, aplicando los criterios físicos y estadísticos ya mencionados, se ha elegido el modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Por otro lado, vista la importancia del fenómeno de difusión interna en la esterificación de ácido benzoico con glicerina y Novozym®435 frente a la misma reacción catalizada por CALBL, se estudia con detalle el transporte interno, cuantificando su efecto en la transformación. Se ha calculado un factor de efectividad del catalizador y se han determinado los parámetros característicos, como la difusividad efectiva o la relación factor de constricción del poro, σ_c , y tortuosidad, τ , en la partícula de Novozym®435.

En la tercera parte de este trabajo, se ha estudiado una de las posibles vías de mejora del bioproceso. Se trata de adicionar una determinada cantidad de agua en el medio de reacción, algo que, dadas las características de la glicerina, favorece notablemente la velocidad del proceso al reducir las limitaciones al transporte interno. Se han realizado una serie de experimentos previos para redefinir el campo experimental de trabajo: para conocer el efecto del agua sobre la solubilidad del ácido benzoico, sobre la viscosidad del medio y sobre la velocidad de transferencia de materia, así como para determinar las condiciones más adecuadas de temperatura y concentración de ácido benzoico para llevar a cabo el proceso. El estudio cinético posterior se llevó a cabo en dichas condiciones, obteniéndose datos útiles para la selección de un modelo cinético que refleja adecuadamente la fenomenología de la síntesis del monobenzoato de glicerol en condiciones de transferencia de materia mejorada por la presencia de agua.

Se ha realizado, además, un nuevo estudio de los fenómenos de transferencia de materia y se ha estudiado la posibilidad de trabajar con disoluciones sobresaturadas de ácido para la producción del monoéster.

La cuarta y última parte de este trabajo se ha centrado en la posible generalización de la forma de operación desarrollada en el mismo a la síntesis de monoglicérido de otros ácidos fenólicos, y se ha probado con la esterificación de glicerina con ácido p-metoxicinámico, catalizada por Novozym®435. Se han realizado varios experimentos para delimitar las condiciones de trabajo en este nuevo sistema. Se estudió la solubilidad, así como los fenómenos de transporte, antes de llevar a cabo el estudio cinético (concentración inicial de ácido entre 20 y 40 g/L, y temperatura entre 50 y 60 °C), tanto en glicerina pura, como en una mezcla de glicerina y agua.

Se ha efectuado un análisis comparativo de los resultados obtenidos para, finalmente, llevar a cabo una caracterización del producto obtenido por esterificación de glicerina con ácido metoxicinámico. Para ello, se ha medido su hidrofobicidad, propiedad relacionada con la transdermicidad, además de determinarse la actividad solar de dicho monoéster mediante la medida del factor de protección solar (SPF) y, por último, su fotoestabilidad, de acuerdo a las técnicas de análisis descritas anteriormente.

7.2 CONCLUSIONES

El trabajo experimental, así como el de análisis de los resultados e interpretación de los mismos, ha permitido la obtención de una serie de conclusiones acerca de la producción de monoglicéridos de ácido benzoico y p-metoxicinámico catalizada por lipasas, que se exponen a continuación clasificadas según la parte de la Memoria a la que corresponden.

Sobre el procedimiento experimental

1. Las técnicas de análisis propuestas son válidas y perfectamente fiables para el seguimiento de los sistemas de reacción aquí estudiados. El análisis por HPLC permite conocer la concentración de los compuestos de forma rápida y sencilla. Se ha podido, así, comprobar la notable selectividad de la lipasa, como catalizador de la reacción, hacia el monoglicérido, mediante la aplicación de técnicas complementarias como HPLC-masas y RMN.

Sobre la obtención del monoglicérido de ácido benzoico con CALBL

2. La lipasa B de *Candida antarctica* se ha seleccionado como el biocatalizador más activo de entre los probados, ya sea mediante el test de hidrólisis de p-NPB, como en la síntesis del producto deseado. Las diferencias observadas respecto de lipasas de otros orígenes han resultado muy significativas, tanto para la enzima en estado libre, CALB-L, como para su derivado inmovilizado comercial, la Novozym®435.
3. Para CALBL, como consecuencia del estudio previo de las variables del proceso en la producción de monobenzoato de glicerina (MG), se ha observado que la temperatura tiene un efecto positivo sobre la solubilidad del ácido en glicerina, así como sobre la velocidad de la reacción. Sin embargo, es un factor determinante para la desactivación del biocatalizador. Por otro lado, la concentración de ácido también tiene un efecto positivo sobre la cinética de la reacción, pero actúa, de manera

sinérgica junto con la temperatura, favoreciendo la desactivación de la lipasa.

Además, no se han detectado problemas de transferencia de materia.

4. Se ha determinado, así, un modelo cinético que representa fielmente los resultados experimentales obtenidos, atendiendo a criterios físicos (valores adecuados de las energías de activación) y estadísticos (intervalos estrechos de las constantes y un buen ajuste a los datos experimentales con el mínimo número de parámetros). El modelo considera una reacción química simple que sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten con una desactivación parcial de la enzima tanto térmica como química, y recoge la influencia de la temperatura y de la concentración de ácido benzoico. Este se muestra en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Modelo y Parámetros cinéticos estimados por ajuste no lineal múltiple de la reacción de esterificación de glicerina con el ácido benzoico catalizada por CALBL.

$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B}$ $a_R = \frac{C_E + C_E \cdot \beta}{C_{E0}}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_E^*}{dt} = -k_{d1} \cdot C_E - k_{d2} \cdot C_E \cdot C_B^b$		<p>Siendo:</p> $\beta = \frac{a_{E^*}}{a_E} = \beta_0^* e^{-\frac{E_{a,\beta}}{RT}}$ $k = k_0^* e^{-\frac{E_{a,k}}{RT}}$ $k_{d1} = k_{d1,0}^* e^{-\frac{E_{a,kd1}}{RT}}$ $k_{d2} = k_{d2,0}^* e^{-\frac{E_{a,kd2}}{RT}}$		
Parámetro	Valor \pm error	SQR	F ₉₅	AICc
E _{a,k} (J/mol)	4,55·10 ⁴ \pm 1,76·10 ³	8,32·10 ⁻³	1,40·10 ⁴	-9.78
ln _{k0}	5,46 \pm 6,46·10 ⁻¹			
K (M)	4,27·10 ⁻¹ \pm 2,53·10 ⁻³			
b	3,09 \pm 9,12·10 ⁻²			
E _{a,kd1} (J/mol)	7,61·10 ⁴ \pm 3,82·10 ³			
ln _{kd1,0}	2,43·10 ¹ \pm 1,37			
E _{a,kd2} (J/mol)	1,34·10 ⁵ \pm 3,29·10 ³			
ln _{kd2,0}	4,92·10 ¹ \pm 1,22			
E _{a,β} (J/mol)	-2,06·10 ⁵ \pm 1,21·10 ⁴			
ln _{β,0}	-7,75·10 ¹ \pm 4,51			

Sobre la obtención del monoglicérido de ácido benzoico con Novozym®435

5. El estudio de la síntesis del monoglicérido de ácido benzoico utilizando el derivado inmovilizado de CALB, Novozym®435, pone de manifiesto diferencias importantes respecto de lo observado con la enzima libre en términos de la influencia de las variables de proceso. Los experimentos previos demuestran que la posible desactivación enzimática por efecto de temperatura y concentración de ácido benzoico deja de ser significativa.

Sin embargo, resultan muy importantes los fenómenos difusionales. Esto se ha podido comprobar con los resultados de una serie de experimentos donde la utilización de catalizador con tamaños más pequeños de partícula, favorece la velocidad de la reacción de esterificación. Por otro lado, y al contrario de lo esperado según el equilibrio de la reacción, la adición de agua al medio tiene un efecto positivo sobre la velocidad, ratificándose la importancia del transporte de materia en este proceso, por disminución de la viscosidad.

6. Se ha establecido un modelo cinético que se ajusta correctamente a todos los datos experimentales a la vez, siguiendo los criterios físicos y estadísticos ya mencionados. De entre los propuestos, el seleccionado junto con el valor de sus parámetros cinéticos y estadísticos se muestra en la Tabla 7.2. Este modelo es del tipo Michaelis-Menten y considera solo la concentración del ácido benzoico, al estar la glicerina en gran exceso y el equilibrio totalmente desplazado hacia los productos. No hay, a diferencia de en la enzima libre, desactivación del biocatalizador.

Tabla 7.2. Modelo y Parámetros cinéticos estimados por ajuste no lineal múltiple de la reacción de esterificación de glicerina con el ácido benzoico catalizada por Novozym®435.

$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B} \quad k = k_0 * e^{-\frac{E_{a,k}}{RT}}$				
Parámetro	Valor \pm error	SQR	F ₉₅	AICc
E _{a,k} (J/mol)	1,43·10 ⁴ \pm 1,39·10 ³	2,25·10 ⁻²	7,74·10 ³	-1·10 ³
ln _{k0}	-2,08 \pm 0,50			
K (M)	4,58·10 ⁻¹ \pm 9·10 ⁻³			

7. Un estudio detallado del transporte de materia descarta la influencia del transporte externo en la velocidad global del proceso. Sin embargo, el control de la velocidad del proceso resulta mixto entre la reacción química y el transporte interno. Se puede calcular, además, un factor de efectividad (alrededor de 0,5), indicio de que el potencial catalizador de la enzima inmovilizada no se está aprovechando a plenitud. Determinado el módulo de Thiele, se han podido obtener valores empíricos de difusividad efectiva o tortuosidad, que resultan inferiores a los valores de referencia dados en la bibliografía. La complejidad interna de la estructura porosa de la partícula de Novozym®435 se debe a las propias características de inmovilización física de la enzima, la cual forma una corona alrededor de la partícula soporte y, además, tiende a agregarse.
8. La adición de agua al medio de reacción favorece la producción del monoéster de varias maneras. La velocidad del proceso aumenta, debido a que se modifica notablemente la viscosidad del medio, facilitando el transporte de materia al interior de los poros de la partícula de catalizador. La gran afinidad del glicerol por el agua, por otro lado, la aleja del centro activo, donde se podría acumular como producto de reacción si esta se realizara en medio orgánico. La mezcla de glicerina y agua favorece, además, la estabilidad de la enzima. Estos efectos positivos compensan el de la solubilidad del ácido, que se ve reducida al aumentar la polaridad del

medio. En cualquier caso, la velocidad del proceso se ve tan favorecida que se ha probado con éxito la operación en condiciones de sobresaturación de ácido benzoico.

9. Se ha propuesto un modelo cinético de tipo hiperbólico que se ajusta a los datos experimentales, para el caso particular de la reacción de esterificación de ácido benzoico y glicerina en un medio con 30% w/w de agua. Los parámetros se muestran en la Tabla 7.3, siendo el modelo muy similar al obtenido en ausencia de agua, pero refleja una mayor actividad de la enzima y una mayor energía de activación: más del doble que en el caso en el que no se añada agua, como corresponde a un sistema en el que la transferencia de materia interna ya apenas influye en la velocidad global del proceso.

Tabla 7.3. Modelo y Parámetros cinéticos estimados por ajuste no lineal múltiple de la reacción de esterificación de glicerina con el ácido benzoico en medio 30% w/w en agua catalizada por Novozym®435.

$\frac{dC_{MB}}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_B}{K + C_B} \quad k = k_0 * e^{-\frac{E_a, k}{RT}}$				
Parámetro	Valor ± error	SQR	F ₉₅	AICc
E _{a,k} (J/mol)	3,77·10 ⁴ ± 2,19·10 ³	2,89·10 ⁻²	4,17·10 ³	-1.1·10 ³
ln _{k0}	-7,25 ± 0,79			
K (M)	4,86·10 ⁻¹ ± 1,3·10 ⁻²			

Sobre la obtención del monoglicérido de ácido p-metoxicinámico

10. La síntesis del monoglicérido de ácido p-metoxicinámico (MG) es viable aplicando el mismo sistema de trabajo desarrollado para el de ácido benzoico. Se comprueba así, que el sistema puede ser de aplicación general para la esterificación catalizada por lipasas, más concretamente por Novozym®435.

11. De los experimentos previos se concluye que la diferencia de comportamiento radica en la propia naturaleza del ácido reactivo. La presencia de radicales hidrofóbicos pueden impedir estéricamente la entrada de la molécula de ácido en el centro activo, reduciendo la actividad. Por otro lado, la mayor hidrofobicidad limita más la solubilidad de este ácido en glicerina. Este fenómeno resulta más importante si se utiliza un medio con 30%w/w agua. Además, se ha probado que las limitaciones al transporte interno resultan menos importantes.
12. Se han obtenido modelos cinéticos para la esterificación de ácido p-metoxicinámico con glicerol tanto en ausencia como en presencia de un 30% de agua (Tablas 7.4 y 7.5, respectivamente). Estos modelos tienen en cuenta dos etapas en serie: operando en condiciones heterogéneas, que corresponde a la disolución sobresaturada en ácido (concentración constante de ácido en la fase líquida) y una segunda en la que todo el ácido está disuelto en la fase líquida (concentración de ácido variable).

Tabla 7.4. Modelo cinético propuesto para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido p-metoxicinámico y glicerina catalizada por Novozym®435 en glicerina pura.

$\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_{M,S}}{K + C_{M,S}}; \text{ Con } k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_{a,k}}{RT}}$ $\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_M}{K + C_M}$				
Parámetro	Valor ± error	SQR	F ₉₅	AICc
E _{a,k} (J/mol)	2,57·10 ⁴ ± 3,67·10 ³	1,13·10 ⁻³	1,23·10 ³	- 4,7·10 ²
ln _{k0}	1,50 ± 1,32			
K (M)	2,81·10 ⁻¹ ± 2,0·10 ⁻³			

Tabla 7.5. Modelo cinético propuesto para el ajuste a los datos experimentales de la reacción de esterificación de ácido p-metoxicinámico y glicerina con Novozym®435 en medio 30% w/w H₂O.

$\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_{M,S}}{K + C_{M,S}}; \text{ Con } k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_{a,k}}{RT}}$ $\frac{dC_{MG}}{dt} = -\frac{dC_M}{dt} = \frac{k \cdot C_E \cdot C_M}{K + C_M}$				
Parámetro	Valor ± error	SQR	F ₉₅	AICc
E _{a,k} (J/mol)	3,82·10 ⁴ ± 3,21·10 ³	7,70·10 ⁻⁴	4,31·10 ³	-5,2·10 ²
ln _{k0}	6,80 ± 1,16			
K (M)	2,81·10 ⁻¹ ± 4,36·10 ⁻³			

13. Finalmente se ha caracterizado el monoglicérido del ácido p-metoxicinámico (MG), observando que su actividad como filtro UV, expresada como factor de protección solar (SPF), es equiparable a la del ácido p-metoxicinámico que lo origina o su éster con 2-metilhexanol (OMC), de uso comercial. La mayor fotoestabilidad del monoglicérido del p-metoxicinámico, así como su mayor hidrofiliicidad en comparación a los compuestos de referencia, permiten pensar en la viabilidad de la aplicación del mono-p-metoxicinamato de glicerol como filtro UV en cremas solares.

8.- Nomenclatura

8. NOMENCLATURA

a	Actividad enzimática
a_R	Actividad enzimática remanente
C_i	Concentración de compuesto i ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ó ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
D_{ij}	Difusividad molecular de compuesto i en compuesto j (cm^2/s)
De	Difusividad efectiva (cm^2/s)
$E_{a,j}$	Energía de activación de constante cinética j ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
F_L	Factor de dilución
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
k, K	Constantes función de las constantes cinéticas y de equilibrio
k_d	Constante cinética de desactivación
$k_{i,0}$	Factor preexponencial de constante cinética
$\log P_{OW}$	Coefficiente de reparto octanol/agua
N	Velocidad de agitación (rpm)
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
r_j	Velocidad de la reacción j ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
R_i	Velocidad de producción del compuesto i ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
R	Constante de los gases ideales ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPF	Factor de protección solar
UV	Ultravioleta
X_i	Conversión de compuesto i

Letras griegas

β	Actividad enzimática residual
ϕ	Módulo de Thiele
λ	longitud de onda (nm)
η	Factor de efectividad
ρ_i	Densidad de i (g/cm^3)
μ	Viscosidad

Compuestos y catalizadores

B	Ácido benzoico
BG	α -monobenzoato de glicerina
BMet	Benzoato de metilo
CALBL	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
E	Enzima
E', E''	Formas parcialmente activas de enzima
E _D	Enzima desactivada
M	Ácido p-metoxicinámico
MG	α -mono-p-metoxicinamato de glicerina
N435	Novozym® 435
PNPB	p-nitrofenilbutirato
PNP	p-nitrofenol
W	Agua

Método BET y BJH

V _m	Volumen monocapa (método BET) (ml)
V _A	Volumen adsorbido (método BET) (ml)
V _M	Volumen molar de nitrógeno (34,6 cm ³ /mol)
P _S	Presión de la muestra (bar)
P ₀	Presión de saturación (bar)
C	Constante relativa a la entalpía de adsorción (0,00156)
S _{BET}	Área superficial BET (m ² ·g ⁻¹)
N _A	Número de Avogadro (6,026·10 ²³)
A _M	Sección transversal ocupada por cada molécula de adsorbato (para N ₂ es igual a 0,162 nm ²)
M _V	Volumen molecular (para N ₂ es igual a 22414 ml)
R _K	Radio Kelvin (cm)
γ	tensión superficial de adsorbato a temperatura igual a T (8,855 mN/m)
R	Constante de gases ideales (8,31·10 ⁷ erg/mol·K)
T _{N2}	Temperatura de ebullición de nitrógeno (77,3 K)
t	Espesor de capa (Å)
R _P	Radio de poro (nm)

9.- Abstract

9. ABSTRACT

This thesis work is entitled “Enzymatic production of monoglycerides by esterification of glycerol with benzoic and p-metoxycinnamic acid” and was developed in the laboratories of the Chemical Engineering Department of the Complutense University of Madrid.

Glycerol is a polyalcohol with numerous applications. It can be found in abundance in nature as part of more complex compounds as triglycerides (fats and oils) or phospholipids. Its industrial interest is significant due to its physical and chemical properties, which makes glycerol a very versatile compound, and therefore, widely used in industries such as pharmaceutical or food. Glycerol's availability has experienced a notorious rise in recent years due to the increase in biodiesel production according to international environmental regulations, owing to glycerol being a major by-product of this process (10% weight). Consequently, price has decreased, and at the same time, more interest has awakened for glycerol industrial application possibilities.

The use of glycerol as feedstock holds special interest in the development of various new sustainable green synthesis processes. Its structure and functionality make its transformation feasible through different types of reactions for the production of nitroglycerine, alkyde resins, rosin resins, triacetin, glycerol carbonate and 1–3 propanediol, among others. In this wide chemical portfolio of possible synthetic processes, esterification of glycerol plays an important role. Some glyceride syntheses with acids of different nature have been reported, featuring applications in several fields, especially in the pharmaceutical and food industries using chemical or enzymatic catalysts. For instance, extensive papers have been published accounting for the production of structured triglycerides by transesterification of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), α -monoglycerides, and synthesis of antioxidants by esterification of phenylpropanoic acids, fragrances or emulsifiers.

Esterification reactions are commonly catalyzed by bases (transesterification reactions) or acids (esterification reactions). On the other hand, lipases are outstanding catalysts in esterification reactions, due to their high activity and selectivity, even in organic media, due to the mild operating

conditions, which favor their application in the production of fine chemicals, especially when working with thermo-sensitive products. Even chirality control is feasible when using enzymes, if needed.

This work is focused on the production of the monoester of two phenolic acids, i.e. benzoic (B) and p-metoxycinnamic (M), in positions 1 or 3 of glycerol. This reaction can be catalyzed by the lipase B of *Candida antarctica* and its commercial immobilized derivative, Novozym®435. Glycerol monobenzoate (BG) has application as a plasticizer and in the pharmaceutical industry for the synthesis of β -blockers, platelet activating factor (PAF), (S)-carnitine, and γ -amino-13-hydroxybutyric acid (GABOB). On the other hand, glycerol p-metoxycinnamate (MG) is an ingredient in cosmetic products, like sun creams, because of its UV-filter properties, which are comparable to commonly used compounds, OMC for example, while improving others like transdermicity. Besides, these processes run in the absence of organic solvents, reducing their environmental and economical impact.

A working procedure has been established for running the trials in a reproducible way. Esterification runs were batch-wise performed in a temperature controlled agitated reactor. And the generated samples were analyzed using different techniques: Esterification reaction samples were analyzed via reverse phase HPLC (C-18 column at 35°C; metanol:agua 3:1 v/v; 1 mL/min). For the identification of the products and the confirmation of their structure, HPLC-MS and NMR were used respectively. Enzyme activity was determined through a PNPB hydrolytic test in a UV-Vis spectrophotometer, and heterogeneous catalyst Novozym®435 was characterized with its Nitrogen BET-isotherms and SEM microscopy. Finally, UV filter properties of MG were tested using an in vitro analysis for measuring the photoactivity in terms of SPF (solar protection factor), of the produced reaction samples. Besides, photodegradation was studied measuring photoactivity of samples subjected to solar radiation, simulated with a solar lamp.

Three major sets of trials were performed attending to different reaction system configurations as part of the development of this process, i.e. esterification of glycerol with benzoic acid catalyzed by CALB, catalyzed by Novozym®435, and catalyzed by Novozym®435 in a medium 30% w/w water.

Then, the built up know-how was successfully applied for the esterification of glycerol with p-metoxicinnamic acid catalyzed by Novozym®435 in medium 30% w/w water.

For every set of trials, previous experimental work was performed to determine the effect of the process variables (reactant concentration and temperature). Enzyme activity inhibition was also tested, finding that, opposite to the expectations based on the reaction equilibrium and literature for esterifications in organic media, the presence of high concentrations of reaction products (monoester and especially water) are not detrimental to the final product yield. This results very useful as water activity is no longer to be controlled, and especially in heterogeneous systems, such as those catalyzed by Novozym®435, where the addition of water decreased mass transfer diffusional limitations improving system kinetics. The complexity of the porous structure of the catalyst particle and the enzyme immobilization process, result in effectiveness factors of 0,5 in pure glycerin, and very close to 0,9 in a 30%w/w water medium. Although aqueous mixtures of glycerol decreased the acid solubility, acid oversaturated conditions were also tested successfully.

Enzyme deactivation was also tested, finding its importance for free enzyme esterification, where acid and temperature act synergically. Immobilization appears to be a very suitable solution to reduce deactivation, so that in trials with Novozym®435 its influence could be neglected. The presence of certain amounts of water favored enzyme stability even further.

Using the experimental data collected for esterification runs under temperature (50-70°C) and concentration (20-60 g/L) ranges defined in the previous trials, several kinetic models for this single reaction are tested, Hyperbolic models, Michaelis-Menten type, are developed based on the Ping-pong Bi-bi mechanism, generally accepted for lipase catalyzed esterification reactions. The best fitting model was selected based on physical and statistical criteria. For CALBL system, the model takes into account the simultaneously occurring enzyme deactivation.

Finally, photoactivity of MG was found similar to the original acid and to the commercial widely used OMC, while improving in terms of transdermicity, which makes MG a suitable product for UV filter applications in sun creams.

These results show that the developed process is suitable for the industrial production of monoglycerides of phenolic acids, using enzymatic catalysis. It opens a wide field of study, as there are numerous products based on phenolic acids with industrial interest. Further research is expected focusing on chirality, continuous operation and scaling up.