






Valorización enzimática de aceite vegetal usado

Enzymatic valorization of used vegetable oil

Mateos, Paula S.^{1*} , Ponzinibbio, Agustín¹ , Briand, Laura E.¹ 

¹ Universidad Nacional de La Plata, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

* stefaniamateos@quimica.unlp.edu.ar

Resumen

Debido a la gran cantidad de aceite comestible desechado en Argentina, el cual contamina el medio ambiente si no es descartado correctamente, es fundamental buscar formas de revalorizarlo. En este contexto, se ha estudiado la obtención de ácido oleico y linoleico a partir de aceite vegetal usado ya que estos ácidos poseen una variada aplicación en la industria. Para ello, se estudió la optimización de las condiciones en la hidrólisis de aceite usado en cocción utilizando el biocatalizador comercial Eversa® Transform. Se investigó el efecto de la cantidad de catalizador, de agua agregada y tiempo de reacción, encontrándose que las cantidades óptimas son un 4% v/p de catalizador, 25% p/p de agua y 4 horas de reacción, a 40°C con una agitación magnética de 500 rpm, alcanzando un rendimiento a ácidos grasos libres del 66.7%. Asimismo, se analizó por resonancia magnética nuclear de hidrógeno la fase oleosa obtenida en las condiciones óptimas de trabajo y se encontraron señales correspondientes a la presencia de ácido oleico y linoleico. Estos resultados fueron comparados con las reacciones de hidrólisis sin el uso de un catalizador y se observó que el mismo presenta un rol clave en el desarrollo de las mismas.

Palabras clave: Eversa® Transform; lipasa; hidrólisis; aceite vegetal usado.

Abstract

Due to the large quantity of waste cooking oil generated in Argentina, which contaminates the environment if not properly disposed of, it is essential to explore ways to valorize it. In this context, the production of oleic and linoleic acids from used vegetable oil has been studied, as these acids have a wide range of industrial applications. To this end, the optimization of the conditions for the hydrolysis of used cooking oil was investigated using the commercial biocatalyst Eversa® Transform. The effects of catalyst loading, added water, and reaction time were evaluated, revealing that the optimal conditions are 4% w/v catalyst, 25% w/w water, and 4 hours of reaction at 40°C with magnetic stirring at 500 rpm, achieving a free fatty acid yield of 66.7%. Furthermore, the oily phase obtained under optimal conditions was analyzed by proton nuclear magnetic resonance, and signals corresponding to the presence





of oleic and linoleic acids were identified. These results were compared with hydrolysis reactions conducted without the use of a catalyst, demonstrating that the catalyst plays a key role in the progression of the reaction.

Keywords: Eversa® Transform; lipase; hydrolysis; used vegetable oil.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite de girasol es el elegido para la cocción por un 60-70% de las familias de nuestro país, del mismo modo, los locales gastronómicos utilizan este aceite y descartan grandes cantidades del mismo luego de su uso (ASAGIR, 2016; Tamashiro, 2023). Si este no se descarta de manera correcta perjudica al medio ambiente generando contaminación de ríos y mares, problemas de oxigenación en la tierra y obstrucciones en las tuberías, resultando esencial su revalorización (Matkovic, 2024).

Teniendo en cuenta que este aceite está compuesto principalmente por triglicéridos que contienen ácido oleico y linoleico, es posible hidrolizar para obtener los ácidos grasos libres (AGL), los cuales tienen múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y textil, entre otras.

En esta contribución se presenta el estudio de la hidrólisis de aceite usado en cocción utilizando el biocatalizador comercial Eversa® Transform, una formulación líquida que contiene la lipasa fúngica *Thermomyces lanuginosus* (TLL). La actividad de las lipasas no se ve perjudicada por la presencia de ácidos grasos libres o agua, por lo tanto, no se requiere la utilización de aceites refinados al usarlas como catalizador. Asimismo, el consumo de energía es menor con respecto a las reacciones catalizadas por ácidos o bases debido a que las enzimas actúan a bajas temperaturas (José *et al.*, 2013).

El biocatalizador Eversa® Transform ha mostrado actividad en reacciones de transesterificación de diversos tipos de aceite, así como también se ha estudiado su uso en la hidrólisis de aceite y se ha encontrado que su temperatura óptima de trabajo es de 40°C (Nielsen *et al.*, 2016; Mateos *et al.*, 2023; Su *et al.*, 2018; Alexandre *et al.*, 2022). Sin embargo, no hay estudios que señalen la cantidad óptima de catalizador, agua agregada y tiempo de reacción en la hidrólisis de aceite de girasol usado en cocción, lo cual condujo al estudio presentado en este trabajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El aceite usado en cocción utilizado en esta investigación se preparó a partir de aceite de girasol fresco (marca comercial Natura, producido en Córdoba, Argentina), el cual fue sometido a la fritura de comidas caseras a 170°C en cinco ciclos de cocción. Este aceite fue filtrado para eliminar restos de comida y no fue sometido a ningún tratamiento adicional. El mismo presentó un índice de acidez de 0.6.

Se utilizó el biocatalizador comercial denominado Eversa® Transform compuesto por una solución de la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes, lote LJP00051). También se utilizaron: hidróxido de potasio (Carlo Erba, 85%), etanol absoluto (Cicarelli 99.5 %), y tolueno (Dorwil, 99.5 %).

2.1. Reacciones de hidrólisis de aceite usado

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo con 20.00 g de aceite usado en un balón calefaccionado a 40°C dentro de un baño de glicerina, bajo agitación magnética a 500 rpm y provisto con un refrigerante. Se realizaron los ensayos con diferentes cantidades de catalizador Eversa® Transform (0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 y 14% v/p) usando 5.0 g de agua agregada (25% p/p) y un tiempo de reacción de 4 horas. También se estudió la influencia de la cantidad de agua agregada, llevando a cabo la reacción con 3.0 y 7.0 g de agua, los cuales corresponden a 15 y 35% p/p respectivamente. Asimismo, se investigó el tiempo óptimo de reacción calculando su rendimiento a ácidos grasos libres a 4, 6, 8, 16 y 24 horas.

Por otra parte, se investigó el efecto del biocatalizador en las reacciones de hidrólisis llevando a cabo reacciones “blanco” en las cuales no se agregó catalizador, este procedimiento se realizó en las diferentes condiciones operativas estudiadas.

2.1.1. Determinación del índice de acidez



Con el objetivo de conocer las condiciones óptimas de la reacción de hidrólisis de aceite usado utilizando Eversa® Transform como catalizador, se determinaron los índices de acidez de las fases oleosas a fin de conocer la cantidad de ácidos grasos libres presentes. Para ello se centrifugaron los medios de reacción luego de cada hidrólisis y se separaron las fases oleosas de las acuosas.

Este procedimiento se realizó siguiendo la Norma Europea 14104, por lo tanto, se pesó 1.00 g de muestra y se disolvió en 10 ml de una solución de etanol-tolueno 1:1 previamente neutralizada. Se tituló con una solución etanólica de KOH 0.1 N, utilizando fenoltaleína como indicador, y se calculó el índice de acidez mediante la Ec. (1):

$$IA = \frac{M_{KOH} V_{KOH} C_{KOH}}{m_{muestra}} \quad (1)$$

donde M_{KOH} es el peso molecular del KOH, V_{KOH} el volumen de KOH utilizado durante la titulación, C_{KOH} es la concentración de KOH y $m_{muestra}$ la masa de la muestra.

2.1.2. Análisis por cromatografía gaseosa

Por otra parte, se llevó a cabo la identificación y cuantificación de los glicéridos presentes en el aceite usado y en la fase oleosa que presentó un mayor índice de acidez. Se estudiaron estas muestras mediante cromatografía gaseosa de acuerdo a la Norma ASTM D6584 y el equipo utilizado fue un GC-2010 Plus Tracera, equipado con un detector BID y una columna capilar (MEGA-Biodiesel 105 de 15 m × 0,32 mm × 0,10 μm). La temperatura del programa comenzó a 50°C, continuó con un aumento de 15°C por minuto hasta 180°C, luego con un incremento de 7°C por minuto hasta los 230°C, y finalmente 30°C por minuto hasta llegar a los 350°C y se utilizó helio como gas portador y tricaprina como estándar.

La identificación de las señales correspondientes a los mono-, di- y triglicéridos fueron motivo de investigación para llevar a cabo la correcta cuantificación de glicéridos, lo cual fue presentado en trabajos previos (Mateos *et al.*, 2023). Con la integración de las señales se calcularon los moles presentes en cada muestra.

2.2.1. Conversión, rendimiento y actividad enzimática específica

A partir de la integración de las señales de mono-, di- y triglicéridos (MG, DG y TG) presentes en ambas muestras se obtuvo el número de moles de los glicéridos presentes y se calculó su conversión durante la reacción de hidrólisis siguiendo la Ec. (2):

$$\% \text{ Conversión de glicéridos} = \frac{(MG+DG+TG)_{convertidos}}{(MG+DG+TG)_{iniciales}} 100 \quad (2)$$

Donde $(MG, DG \text{ y } TG)_{iniciales}$ corresponde a la sumatoria de los moles de mono-, di- y triglicéridos presentes en el aceite usado en cocción y los $(MG, DG \text{ y } TG)_{convertidos}$ los moles de glicéridos que se convirtieron durante la hidrólisis.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de los análisis por cromatografía gaseosa y la determinación del índice de acidez, se calculó el rendimiento a ácidos grasos libres según la Ec. (3):

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

Donde los moles de ácidos grasos libres formados son determinados mediante la resta entre los ácidos grasos obtenidos luego de la hidrólisis y los presentes en el aceite de partida.

La actividad enzimática específica (AEE) se calculó utilizando la Ec. (4):

$$\text{Actividad enzimática específica} = \frac{\text{micromoles glicéridos convertidos}}{\text{masa TLL (mg) tiempo (h)}} \quad (4)$$

Donde los micromoles de glicéridos convertidos fueron determinados en base a los análisis por cromatografía gaseosa, la masa TLL es la masa de la lipasa *Thermomyces lanuginosus* que se encuentra en

la cantidad de biocatalizador utilizado en la reacción de hidrólisis en las condiciones óptimas encontradas y el tiempo es el de la reacción de hidrólisis.

La cantidad de lipasa *Thermomyces lanuginosus* por gramo de biocatalizador comercial Eversa® Transform fue determinado mediante estudios por espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), a partir de la cantidad de azufre presente y teniendo en cuenta la secuencia de esta proteína.

2.3.1. Análisis por resonancia magnética nuclear

A fin de estudiar la presencia de ácido oleico y linoleico en la fase oleosa luego de la reacción de hidrólisis, se analizó la presencia de las señales características de los mismos mediante un estudio por resonancia magnética nuclear de hidrógeno. Para ello se realizó un espectro completo en CDCl_3 (500MHz), medido a 25°C en un equipo Bruker AVANCE NEO 500 con un imán superconductor blindado de 11.75 Tesla Ascend 500.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Reacciones de hidrólisis de aceite usado

Con la finalidad de obtener ácidos oleico y linoleico a partir de la hidrólisis de aceite vegetal usado, se investigaron las condiciones óptimas para llevar a cabo esta reacción utilizando el biocatalizador comercial Eversa® Transform. Por consiguiente, se estudió el efecto de la cantidad de biocatalizador empleada, de agua agregada y el tiempo de reacción.

3.1.1. Determinación del índice de acidez

A partir de los valores de índice de acidez del aceite usado y de las fases oleosas obtenidas luego de las reacciones de hidrólisis en las diferentes condiciones estudiadas, se determinaron las condiciones más adecuadas para este tipo de reacción al usar el biocatalizador Eversa® Transform. En la Fig. 1 se puede observar los índices de acidez determinados luego de las reacciones al usar 20.00 g de aceite usado con un 0 a 14% v/p de catalizador. Al aumentar la cantidad de enzima por arriba del 4% v/p se encontró que el índice de acidez disminuye, lo cual podría deberse a la disminución de la actividad enzimática por aglomeración de la misma, como se ha observado en estudios anteriores (Mateos *et al.*, 2023).

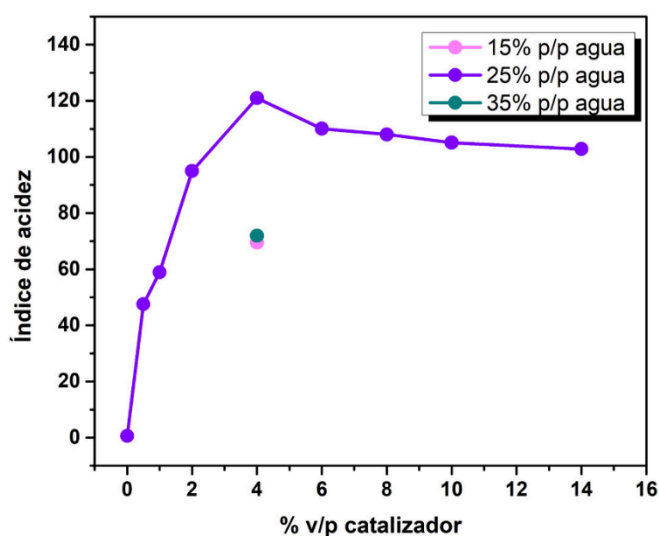


Figura 1. Índice de acidez luego de la hidrólisis de 20.00 g de aceite usado en cocción al utilizar distintas cantidades de catalizador y de agua agregada, a 40°C, 500 rpm y 4 horas de reacción.

Asimismo, se estudió el efecto de la cantidad de agua agregada usando la cantidad óptima de catalizador. Para ello se investigó la hidrólisis con un 15 y un 35% p/p de agua agregada, lo que en la figura se ve representado como los puntos rosa y verde, respectivamente. Como se ve en el gráfico, al utilizar estas cantidades de agua el índice de acidez obtenido fue más bajo. Este hallazgo concuerda con reportes previos que indican que un leve incremento en la cantidad de agua en la hidrólisis aumenta la actividad de la enzima debido al mejoramiento en su conformación y a una mayor área interfacial, sin embargo, una gran cantidad de agua podría inhibir la actividad de la misma (Mulinari *et al.*, 2017).

A partir de estos resultados se continuó con el estudio de la actividad de Eversa® Transform llevando a cabo las reacciones con las cantidades óptimas de biocatalizador y de agua agregada, 4% v/p y 25 % p/p respectivamente.

Se realizaron reacciones de hidrólisis entre 4 y 24 horas observando una leve disminución en el índice de acidez luego de las 4 horas de reacción, como se observa en la Fig. 2.

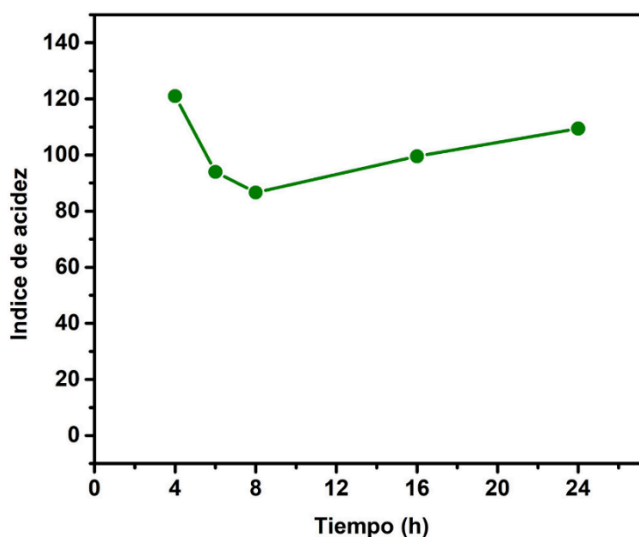


Figura 2. Índice de acidez luego de la hidrólisis de 20.00 g de aceite usado en cocción utilizando un 4% v/p de catalizador, 25% p/p de agua agregada, a 40°C, 500 rpm y distintos tiempos de reacción.

El estudio de las reacciones de hidrólisis sin catalizador dio como resultado que los índices de acidez de las fases oleosas fueron cercanos al del aceite antes de la hidrólisis en todos los casos, demostrando que la actividad del catalizador es clave en estas reacciones.

3.1.2. Análisis por cromatografía gaseosa

(a)

(b)

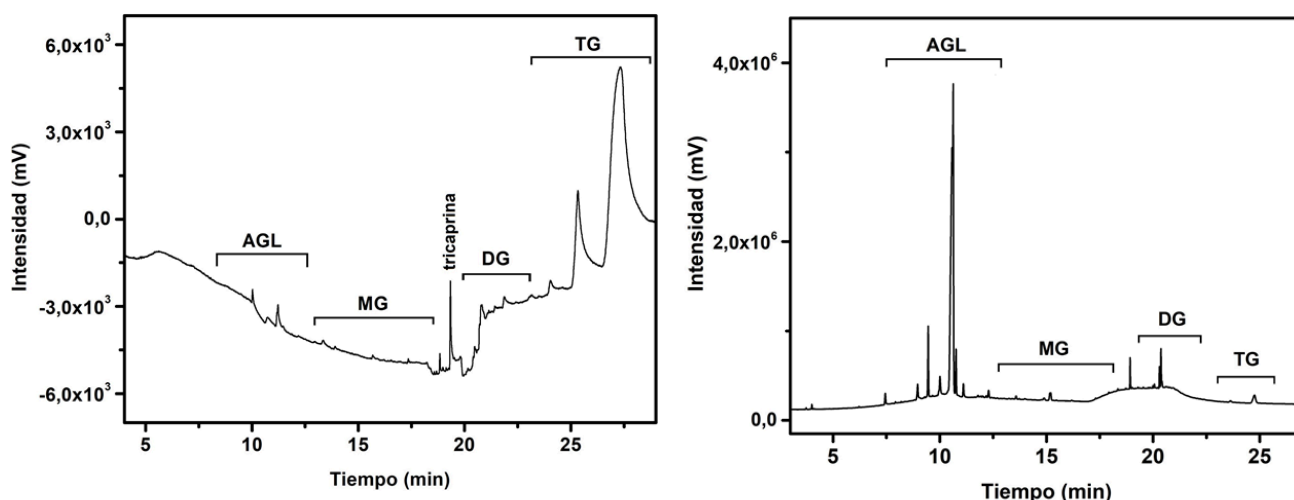


Figura 3. Señales obtenidas del análisis por cromatografía gaseosa del aceite usado en cocción (a) y del medio de reacción luego de la hidrólisis de 20.00 g de aceite usado en cocción utilizando un 4% v/p de catalizador, 25% p/p de agua agregada, a 40°C, 500 rpm y 4 horas de reacción (b).

En la Fig. 3 se presenta el cromatograma del aceite usado en cocción (Fig. 3a) y de la fase oleosa luego de la reacción de hidrólisis que condujo a un mayor índice de acidez (Fig. 3b). En ambos se observan las señales correspondientes a: ácidos grasos libres (9-12 min), monoglicéridos (12-19 min), diglicéridos (19-22 min) y triglicéridos (22-28 min).

Se observa que luego de la hidrólisis las señales de los triglicéridos disminuyen considerablemente mientras aumentan las pertenecientes a los ácidos grasos libres, lo cual concuerda con un aumento en el índice de acidez, indicando que hubo hidrólisis de los triglicéridos presentes en el aceite.

Asimismo, el estudio por cromatografía gaseosa permitió llevar a cabo un análisis cuantitativo de los glicéridos presentes, como se detalla en la sección 2.2.1.

3.2.1. Conversión, rendimiento y actividad enzimática específica

A partir de los análisis por cromatografía gaseosa y determinación del índice de acidez se calculó la conversión de glicéridos, rendimiento a ácidos grasos libres y actividad enzimática específica en la hidrólisis de aceite usado en cocción en las condiciones óptimas encontradas. Para ello se usaron las ecuaciones que se detallan en la sección 2.2.1 y fueron representadas en la Fig. 4.

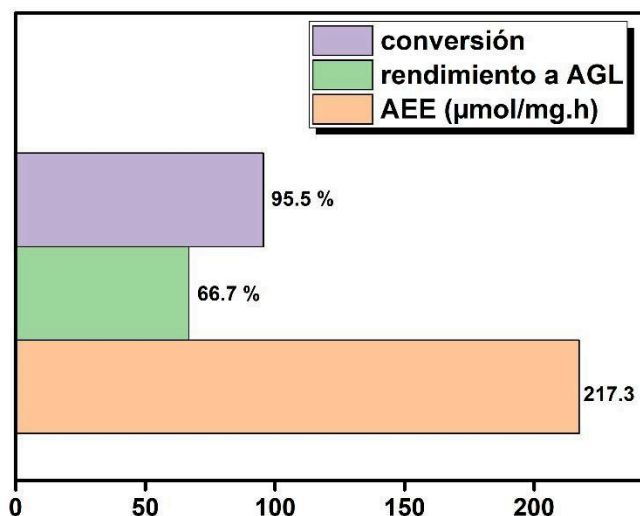


Figura 4. Conversión de glicéridos, rendimiento a ácidos grasos libres (AGL) y actividad enzimática específica (AEE) al utilizar un 4% v/p de catalizador, 25% p/p de agua agregada y 4 horas de reacción en la hidrólisis de 20.00 g de aceite usado en cocción, a 40°C y 500 rpm.

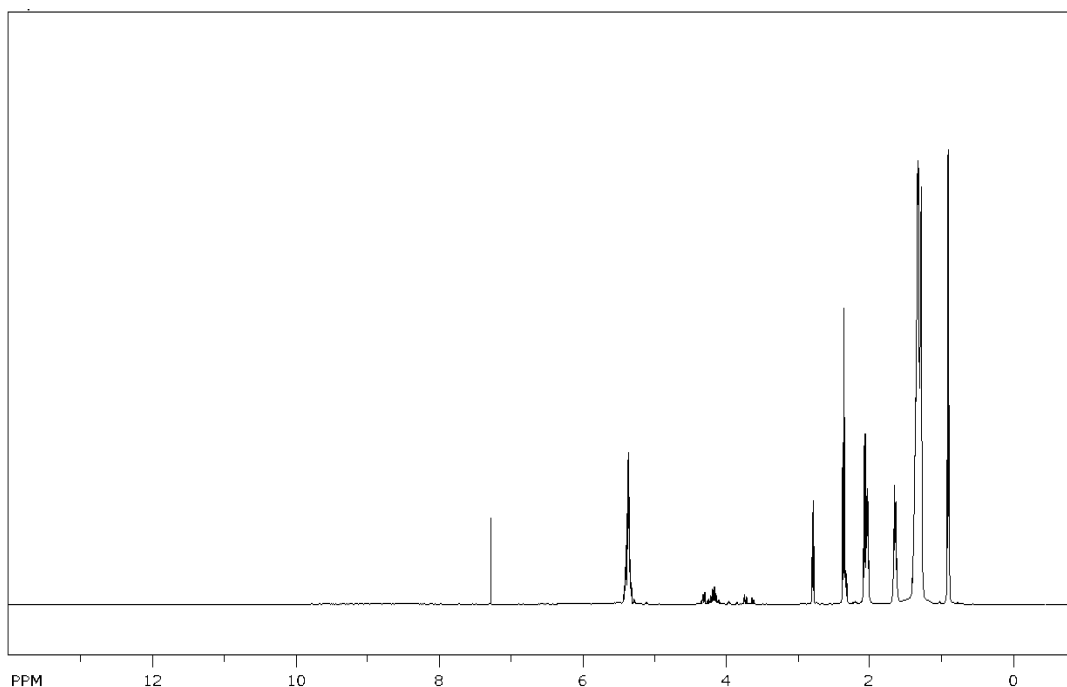
Como se ve en el gráfico, la conversión alcanzó un 95.5% en la hidrólisis de aceite con un 4% v/p de Eversa® Transform y 25 %p/p de agua a 40°C y 500 rpm durante 4 horas. El rendimiento a ácidos grasos libres fue del 66.7%, lo cual podría deberse a la regioselectividad de la lipasa ya que en los últimos años se han reportado estudios que indican que este tipo de enzimas hidrolizan los enlaces de tipo éster presentes en las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos. Esta característica que presentan las lipasas da lugar a un rendimiento a ácidos grasos libres máximo del 66.7% ya que conduce a la formación de monoglicéridos (Mateos *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2021; Park J. Y. y Park K. M., 2022).

2.3.1. Análisis por resonancia magnética nuclear

En la Fig. 5 se muestra el espectro RMN-1H de la fase oleosa luego de la hidrólisis en las condiciones óptimas encontradas.

El espectro presenta señales características de los ácidos grasos insaturados ($\delta = 2.061, 2.789$ y 5.361 ppm) y ausencia de una señal a los 0.97 ppm, correspondiente al ácido linolénico (Siudem *et al.*, 2022).

(a)



(b)

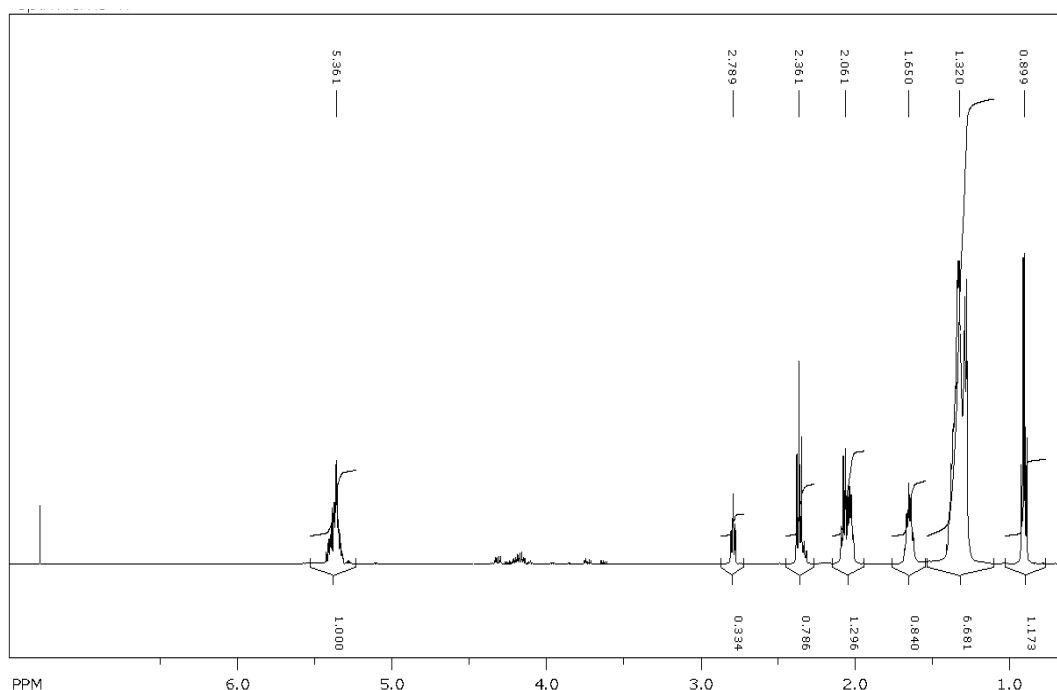


Figura 5. Espectro de RMN 1H en CDCl_3 (500MHz) con valores de δ (ppm) e integrales de una muestra de fase oleosa luego de la hidrólisis de 20.00 g de aceite usado con 4% v/p de biocatalizador, 25% p/p de agua agregada y 4 horas de reacción a 40°C y 500 rpm, entre 14 y 0 ppm (a) y 8 y 0 ppm (b).

El análisis de las señales permitió determinar la presencia de ácidos grasos insaturados y ausencia del ácido linolénico, luego de la hidrólisis. Estos resultados junto con los datos de la composición inicial del aceite de girasol, los cuales han sido reportados previamente, indicarían la presencia de ácido oleico y linoleico (Mateos, 2024).

4. CONCLUSIONES

A partir de esta investigación se determinó que el aceite de girasol usado en cocción puede ser revalorizado mediante una hidrólisis del mismo utilizando como catalizador la formulación líquida Eversa® Transform. Las condiciones óptimas para esta reacción son 4% v/p de biocatalizador, 25% p/p de agua agregada y 4 horas de reacción a 40°C y una agitación de 500 rpm, obteniéndose una conversión del 95.5% y un rendimiento a ácidos grasos del 66.7%. Por otra parte, el análisis por RMN 1H permitió detectar la presencia de los ácidos oleico y linoleico, los cuales tienen múltiples aplicaciones en diversas industrias.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONICET por la beca posdoctoral otorgada y el proyecto plurianual PIP 2016, y a la UNLP por el financiamiento a través del Proyecto de Ciencia y Técnica 11/X898.

Referencias

- Alexandre, J. Y. N. H., Cavalcante, F. T. T., Freitas, L. M., Castro, A. P., Borges, P. T., de Sousa Junior, P. G., Filho, M. N. R., Lopes, A. A. S., da Fonseca, A. M., Lomonaco, D., de Sousa Rios, M. A. y Sousa dos Santos, J. C. (2022). A Theoretical and Experimental Study for Enzymatic Biodiesel Production from Babassu Oil (*Orbignya* sp.) Using Eversa Lipase. *Catalysts*, 12(11), 1322. <https://doi.org/10.3390/catal12111322>
- José, C., Austic, G. B., Bonetto, R. D., Burton, R. M. y Briand, L. E. (2013). Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel. *Catalysis. Today*, 213, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.02.013>



- Li, Y., Li, G y Sun, H. (2021). Characterization of a novel sn1,3 lipase from *Ricinus communis* L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate. *Scientific Reports*, 11, 6913.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-86305-z>
- Mateos, P. S., Casella, M. L., Briand, L. E. y Matkovic, S. R. (2023). Transesterification of waste cooking oil with a commercial liquid biocatalyst: Key information revised and new insights. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 100(4), 287-301. <https://doi.org/10.1002/aocs.12683>
- Mateos, P. S. (2024). *Valoración de aceite comestible de desecho mediante catálisis heterogénea utilizando catalizadores enzimáticos e inorgánicos de naturaleza ácida* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/168312>
- Matkovic, S. R. (17 de abril de 2024). Qué hacer con el aceite de cocina usado: ¿Se puede reciclar? *National Geographic*.
<https://www.nationalgeographicla.com/medio-ambiente/2024/04/que-hacer-con-el-aceite-de-cocina-usado-se-puede-reciclar>
- Mulinari, J., Venturin, B., Sbardelotto, M., Dall Agnol, A., Scapini, T., Camargo, A. F., Baldissarelli, D. P., Modkovski, T. A., Rossetto, V., Dalla Rosa, C., Reichert Jr., F. W., Golunski, S. M., Vieitez, I. y Vargas, G.D.L.P. (2017). Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35(Part A), 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.007>
- Nielsen, P. M., Rancke-Madsen, A., Holm, H. C. y Burton, R. (2016). Production of biodiesel using liquid lipase formulations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(7), 905-910.
<https://doi.org/10.1007/s11746-016-2843-4>
- Park, J. Y. y Park, K. M. (2022). Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *Journal of Chemistry*, 2022(1), 7609019. <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>
- Prensa Nidera. (12 de octubre de 2016). Aceite de girasol: por qué es el más elegido. *Agrofy*.
<https://news.agrofy.com.ar/noticia/161392/aceite-girasol-que-es-mas-elegido>
- Siudem, P., Zielińska, A. y Paradowska, K. (2022). Application of 1H NMR in the study of fatty acids composition of vegetable oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 212, 114658.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114658>
- Su, C. H., Nguyen, H. C., Nguyen, M. L., Tran, P. T., Wang, F. M. y Guan, Y. L. (2018). Liquid lipase-catalyzed hydrolysis of gac oil for fatty acid production: Optimization using response surface methodology. *Biotechnology Progress*, 34(5), 1129-1136. <https://doi.org/10.1002/btpr.2714>
- Tamashiro, S. (29 de diciembre de 2023). Que no vaya a la cañería: los beneficios ambientales y económicos de reciclar el aceite usado. *ElDiarioAr*.
https://www.eldiarioar.com/sociedad/medio-ambiente/no-caneria-beneficios-ambientales-economicos-reciclar-aceite-usado_1_10796051.html