

Síntesis de sílicas mesoporosas a partir de moldeantes renovables para el desarrollo de catalizadores heterogéneos enzimáticos y su aplicación en reacciones de esterificación de interés en química fina

Synthesis of mesoporous silicas from renewable moldings for the development of heterogeneous enzymatic catalysts and their application in esterification reactions of interest in fine chemistry

Presentación: 4 y 5 de Octubre de 2022

Doctorando/a:

Carrillo Germán

Centro de Investigación y Tecnología Química, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Córdoba - Argentina.
gcarrillo@frc.utn.edu.ar

Director/a:

Griselda Eimer

Codirector/a:

Eliana G. Vaschetto, Gabriel O. Ferrero

Resumen

En este plan de trabajo se diseñarán, sintetizarán y caracterizarán sílicas mesoporosas nanoestructuradas a partir de agentes moldeantes renovables (monoestearato de glicerilo y glicerol) para desarrollar catalizadores heterogéneos, a fin de evaluarlos en reacciones de esterificación de relevancia en el campo de la química fina. Estos materiales se modificarán mediante el método de impregnación húmeda, con contenido de Ca 2,5 % p/p. Los catalizadores serán caracterizados por isotermas de adsorción y desorción de N₂, Área superficial por método Brunauer–Emmett–Teller, Difracción de Rayos X y Espectroscopía Infrarrojo. De esta manera se pretende aportar sustentabilidad a la industria química, a partir del empleo de glicerol residual y/o monoestearato de glicerilo para la síntesis de los soportes catalíticos mesoporosos y de una vía enzimática de esterificación que permite condiciones de reacción suaves y eco-compatibles.

Palabras clave: Surfactante, Renovable, Sílica mesoporosa, Inmovilización, Esterificación.

Abstract

In this work plan, nanostructured mesoporous silicas will be designed, synthesized and characterized from renewable molding agents (glyceryl monostearate and glycerol) to develop heterogeneous catalysts, in order to evaluate them in esterification reactions of relevance in the field of fine chemistry. These materials will be modified by the wet impregnation method, with Ca 2.5 % w/w content. The catalysts will be characterized by N₂ adsorption and desorption isotherms, Brunauer – Emmett – Teller surface area analysis, X-Ray Diffraction and Infrared Spectroscopy. In this way, it is intended to bring sustainability to the chemical industry, from the use of residual glycerol and/or glyceryl monostearate for the synthesis of mesoporous catalytic supports and an enzymatic esterification pathway that allows mild and eco-compatible reaction conditions.

Keywords: Surfactant, Renewable, Mesoporous silica, Immobilization, Esterification.

Introducción

En la actualidad la industria química se enfrenta a grandes retos asociados con la reducción de costos, la mejora de la calidad, la seguridad, la protección de la salud y los requisitos medioambientales. La catálisis es hoy una de las encargadas de afrontar dichos desafíos presentes en diversos procesos químicos, entre ellos los de Química Fina. Esta última, se caracteriza por la síntesis y producción industrial de productos químicos de altísimo valor agregado, tales como la producción de disolventes orgánicos, materias primas para polimerizaciones, productos de partida para la síntesis de agroquímicos, síntesis de principios activos para la industria farmacéutica, antibióticos y sustancias utilizadas en la industria alimenticia, entre otras (Bommarius et al., 2011).

Dentro de las reacciones de importancia económica en la industria de químicos finos se encuentra la producción de ésteres, compuestos de alto valor añadido que conforman fragancias y sabores. Estas sustancias son producidas mediante reacciones de esterificación o transesterificación y son utilizadas en la industria alimenticia, farmacéutica y en la obtención de productos de higiene personal (Meneses et al., 2017). La mayoría son extraídos de fuentes naturales y muchos de ellos son difíciles de aislar de sus matrices. Por su parte, los procedimientos basados en la producción de ésteres por vías tradicionales requieren el uso de catalizadores inorgánicos a temperaturas entre 200-250°C y la generación de subproductos que contaminan el producto deseado, siendo esto una gran desventaja para la industria en general. Para superar tales inconvenientes en los últimos años ha surgido el empleo de sistemas enzimáticos comerciales que sustituyen a los catalizadores homogéneos ácidos utilizados en Química Fina para la síntesis de ésteres, éteres y amidas (Gao et al., 2016). Los procesos biocatalíticos ofrecen ciertos atractivos frente a la catálisis química tradicional como el aumento en la velocidad de reacción, regulación de la actividad catalítica, estereoselectividad, biodegradabilidad, utilización de materia prima renovable y condiciones de reacción menos agresivas, ofreciendo eficiencia, selectividad, simplificación de las operaciones y promoviendo la Química Verde. Sin embargo, el uso industrial de las enzimas presenta una serie de inconvenientes relacionados con su vida útil, su estabilidad frente a diversos agentes (oxidantes o reductores, pH, temperatura), su separación del medio de reacción y el elevado costo de su producción. En este sentido, la inmovilización de especies biológicamente activas sobre matrices inorgánicas (resinas, óxidos, soportes mesoporosos, etc.) combina la selectividad de las reacciones enzimáticas con las propiedades químicas y mecánicas del soporte brindando una solución a las desventajas anteriormente mencionadas. (Popova et al., 2018). Dentro de los posibles sólidos a emplear como soportes, los tamices moleculares mesoporosos presentan propiedades específicas muy atractivas para tal fin: grandes áreas (~1000 m²/g) y volumen de poros (~1 cm³/g), comportamiento hidrofóbico o hidrofílico, posibilidad de interacciones electrostáticas, resistencia mecánica y química, sistema de poros del orden de 2 a 10 nm que hace posible discriminar moléculas de acuerdo con su tamaño y permitir la difusión del sustrato y el producto (Ferrero et al., 2016).

Para la síntesis de estos sólidos, los surfactantes usados convencionalmente, tales como Triton X-100, Pluronic P123 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTA), son de naturaleza diversa: catiónicos, aniónicos, aminas, polímeros, entre otros. Su selección depende de las características morfológicas requeridas para las micelas a formarse durante la síntesis de la estructura porosa deseada. La mayor desventaja de estos surfactantes es su costo y la necesidad de importarlos debido a que ninguno es producido localmente. En la actualidad la posibilidad

de reemplazar los surfactantes convencionales por porógenos alternativos, renovables y de menor costo presenta gran interés científico y tecnológico. Estudios recientes muestran las ventajas de usar surfactantes no iónicos (neutros), con relación a surfactantes que involucran interacciones electrostáticas, tales como su fácil remoción y tendencia a producir estructuras con paredes más gruesas y sólidos de menor tamaño de partícula, lo cual mejora la estabilidad y la textura porosa. Así, se contempla la utilización de agentes moldeantes económicos y de alta disponibilidad comercial, específicamente el glicerol (Gli) y el monoestearato de glicerilo (MEG), los cuales son derivados de la industria oleoquímica. En la última década y como consecuencia del impulso en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales, se ha generado un exceso de glicerol, convirtiéndose en un residuo más que en un subproducto de interés. Con este escenario, muchos investigadores se esfuerzan por desarrollar estrategias económicas para el uso de glicerol crudo con la finalidad de hacer sostenible el costo y la producción de biodiesel a largo plazo. La naturaleza química de este polialcohol orgánico con tres grupos hidroxilos, le confiere un carácter polar e hidrofílico además de ser un líquido viscoso, no tóxico y de bajo precio. Todas estas características hacen que sea sumamente interesante su uso como moldeante no iónico de la estructura porosa para la producción de materiales mesoporosos. (Navlani-García et al., 2019) Según algunos reportes, las sílices producidas en estas condiciones son hidrotérmicamente más estable que las sílices MCM-48, MCM-41 y SBA-15 (Peña et al., 2008). Debido a que el Gli tiene un tamaño molecular relativamente pequeño, se espera que genere poros pequeños en la sílice; por lo tanto, para tratar de aumentar el tamaño de dichos poros se propone también el uso adicional de MEG. Asimismo, la posibilidad de modificar la red silícea con diferentes metales alcalinos provee también la oportunidad de explorar estrategias que combinen sinérgicamente la reactividad del soporte con la de la enzima inmovilizada. Se ha demostrado que materiales mesoporosos modificados con calcio o sodio incrementan la actividad de la lipasa inmovilizada *Pseudomonas fluorescens* para producir biodiesel (Ferrero et al., 2020). Por lo tanto, estudiar el efecto de metales soportados sobre la actividad de la enzima inmovilizada constituye también otro desafío para este trabajo.

Desarrollo

Síntesis de los materiales

De lo planteado en el plan de tesis, se ha logrado sintetizar los materiales empleando como reactivos: el tetraetoxisilano (TEOS) como fuente de Si, los porógenos Gli y MEG como directores de la estructura, etanol como solvente, HCl como regulador de pH y NaF como inductor de la condensación de la sílice. Luego de uno, dos y tres días de tratamiento hidrotérmico a 85 °C, filtración, secado a 60 °C durante 24 h y de calcinación con flujo de aire a temperatura controlada, se obtuvieron las sílices mesoporosas que fueron identificadas como “Matriz Gli zD” y “Matriz MEG zD”, siendo z la cantidad de días que se hayan sometido a tratamiento hidrotérmico las muestras (de uno a tres días). Posteriormente, a través de la técnica de impregnación húmeda, se modificaron las matrices con un contenido de Ca del 2,5 % p/p, utilizando CaCl₂ como sal precursora; se mezcló el soporte con una solución acuosa de la sal del metal y a continuación se removió el agua con un evaporador rotatorio a 60 °C. El sólido resultante se secó y calcinó en mufla. Se estudiaron como variables la naturaleza de la sal precursora, porcentaje de carga del metal y temperatura de calcinación. El material obtenido fue identificado como “Matriz MEG/2,5” Ca o “Matriz Gli/2,5 Ca”. Por último, se realizó la inmovilización enzimática sobre los materiales impregnados con Ca. La lipasa fue adquirida comercialmente de la empresa Sigma-Aldrich. Esta es una preparación enzimática producida por un proceso de fermentación de la cepa *Pseudomonas Fluorescens*. El soporte fue incubado con una solución de dicha enzima en buffer fosfato dejándolo bajo rotación por 24 h. Luego se procedió al lavado, centrifugado y secado del material. A los nuevos sólidos se lo denominó “Matriz Gli/2,5 Ca/PF” y “Matriz MEG/2,5 Ca/PF”.

Caracterización

Matriz MEG y Matriz Gli fueron caracterizadas por isotermas de adsorción/desorción de N₂, área superficial por método Brunauer-Emmett- Teller (BET). Las distribuciones del tamaño de poro se determinaron mediante el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Difracción de Rayos X (DRX) recogiendo los datos entre 2θ = 0.5-6 (bajo ángulo). La presencia de la enzima inmovilizada en los sólidos sintetizados fue evidenciada por Espectroscopía de Infrarrojo (IR).

Evaluación catalítica

En este plan de trabajo se pretende utilizar los materiales sintetizados como catalizadores en la síntesis de ésteres alifáticos de peso molecular medio. Se espera evaluar la actividad de los soportes, de las enzimas libres y de los biocatalizadores en la reacción de esterificación de ácidos orgánicos (acético, propanoico y butírico) con los alcoholes 2-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e isopentanol a fin de obtener los ésteres correspondientes. Para ello, se empleará un reactor batch termostatzado con agitación, a 40° C y 200 rpm. Se espera evaluar la influencia de diferentes condiciones de reacción tales como concentración de sustratos, temperatura, pH, tiempo de reacción y el contenido de agua necesario para lograr un óptimo de actividad enzimática. Los productos de interés a diferentes tiempos de reacción se identificarán por Cromatografía Gaseosa (CG) utilizando un equipo Perkin Elmer modelo Clarus-500 con detector de ionización de llama (FID), con patrones cromatográficos de referencia.

Resultados

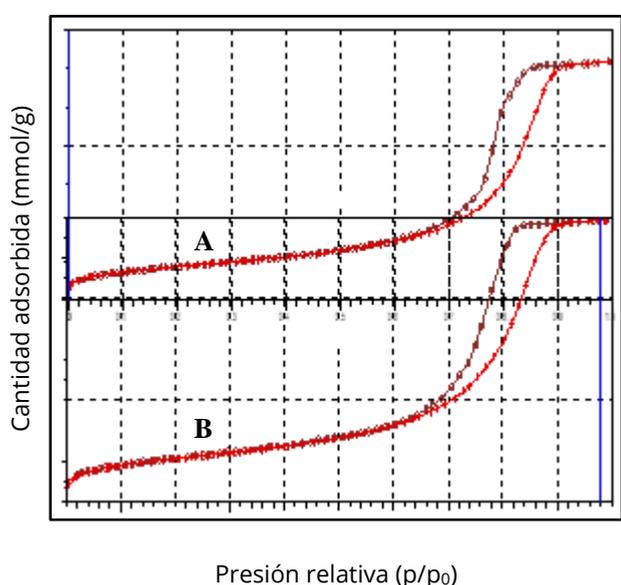


Figura 1: Isotermas de adsorción/desorción de N₂. A) Matriz Gli 3D. B) Matriz MEG 3D

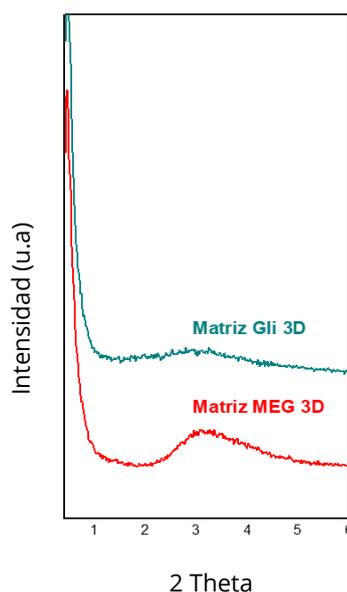


Figura 2: DRX a bajo ángulo de los materiales sintetizados

De los objetivos propuestos en el plan, se logró avanzar con la síntesis de los materiales por el método sol-gel descrito anteriormente y su posterior caracterización. La Fig. 1A y 1B representa las Isotermas de adsorción/desorción de N₂ para los sólidos Matriz Gli 3D y Matriz MEG 3D, respectivamente. Las isotermas mostradas pudieron ser clasificadas de tipo IV, siendo típicas de estructuras mesoporosas, donde las curvas de histeresis exhiben una marcada inflexión para una presión relativa de

alrededor de 0,65 a 0,7 característica de una condensación capilar por dentro de los mesoporos. También se observaron diámetros de poro del orden de los 8 a 10 nm típicos de materiales mesoporosos. Estas determinaciones se complementaron con el análisis de área BET y la difracción de rayos X a bajo ángulo, que evidenciaron un patrón característico de los materiales mesoporosos (Vaschetto et al., 2021). El análisis de características estructurales arrojado por las isotermas de adsorción/desorción indica que el tamaño de poro originado a partir del empleo de MEG como porógeno (9,7 nm) es mayor que el originado por el Gli (8,7 nm) por lo que la Matriz MEG 3D fue seleccionada para su posterior impregnación con Ca e inmovilización enzimática. Como se observa en la Tabla 1, el sólido modificado con Ca presentó una disminución del área BET respecto de la matriz pura, la cual es asignada posiblemente a la presencia del metal impregnado en la superficie.

MATERIAL	ÁREA BET (m ² /g)
Matriz Gli 3D	338
Matriz MEG 3D	347,05
Matriz MEG 3D/2,5 Ca	313

Tabla 1: Análisis de ÁREA BET

La espectroscopia infrarroja es una técnica muy utilizada para estudiar la subestructura de los péptidos y las proteínas y puede utilizarse para controlar la presencia de las proteínas en los soportes. En la Fig. 3 se observan los espectros IR de la enzima libre (rojo) de “Matriz MEG/2,5 Ca/PF” (violeta) y Matriz MEG/2,5 Ca (verde). Como se puede observar, la banda asignada al grupo amida (1645 cm^{-1}), grupo funcional característico de las proteínas, fue detectada solamente en Matriz MEG/2,5 Ca/PF, evidenciando que la inmovilización de la enzima en la matriz silíceá ha sido efectiva. Esta banda indica además que la estructura secundaria de la proteína ha sido conservada, por lo que se esperaría sea favorable para su actividad enzimática (Ferrero et al., 2021).

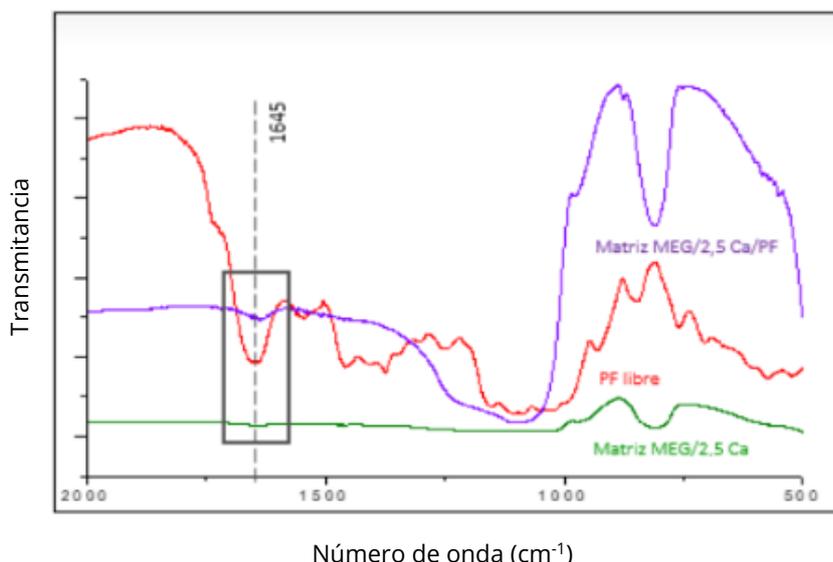


Figura 3: Espectroscopía IR de los materiales

Conclusiones

Se logró sintetizar exitosamente materiales mesoporos a partir de moldeantes renovables (Gli y MEG) evidenciando su estructura mediante DRX a bajo ángulo, isotermas de adsorción/desorción de N_2 y análisis de área BET. Estos materiales fueron impregnados con Ca e inmovilizados con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Abordando diversos aspectos de la Ingeniería de Materiales y la Biocatálisis, se han logrado desarrollar catalizadores enzimáticos heterogéneos a partir de una síntesis novedosa de soportes mesoporos de sílica, que emplea materias primas renovables como moldeantes. Con la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* se pretende lograr materiales híbridos con actividad específica en la esterificación de ácidos carboxílicos para la obtención de ésteres alifáticos, productos de interés en el campo Química Fina comúnmente empleados como aromatizantes y saborizantes, en la búsqueda de procesos de tecnología química más sustentables.

Como objetivos a largo plazo de este plan de tesis, se busca determinar las condiciones óptimas para la actividad enzimática en los biocatalizadores sintetizados, analizar la posible desactivación y reutilización del biocatalizador en función de sus propiedades fisicoquímicas y de las condiciones de reacción y reformularlos en función de los resultados de la evaluación catalítica, en la búsqueda de un mayor rendimiento y selectividad a los productos deseados.

Referencias

- Bommarius, A. S., Blum, J. K., & Abrahamson, M. J. (2011). Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 194–200. doi.org/10.1016/J.CBPA.2010.11.011.
- Ferrero, Faba, E. M. S., & Eimer, G. A. (2021). Biodiesel production from alternative raw materials using a heterogeneous low ordered biosilicified enzyme as biocatalyst. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 1–11. doi.org/10.1186/S13068-021-01917-X/TABLES/3

- Ferrero, G. O., Rojas, H. J., Argaraña, C. E., & Eimer, G. A. (2016). "Towards sustainable biofuel production: Design of a new biocatalyst to biodiesel synthesis from waste oil and commercial ethanol". *Journal of Cleaner Production*, 139, 495–503. doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.08.047
- Ferrero, Sánchez Faba, E. M., Rickert, A. A., & Eimer, G. A. (2020). "Alternatives to rethink tomorrow: Biodiesel production from residual and non-edible oils using biocatalyst technology". *Renewable Energy*, 150, 128–135. doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.12.114
- Gao, W., Wu, K., Chen, L., Fan, H., Zhao, Z., Gao, B., Wang, H., & Wei, D. (2016). "A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short - chain flavor esters". *Microbial Cell Factories*, 1–12. doi.org/10.1186/s12934-016-0435-5
- Meneses, A. C. De, A, A. G. A. S., Henrique, P., & Araújo, H. De. (2017). "Trends in Food Science & Technology. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food , cosmetics and pharmaceuticals industries". 69. doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004
- Navlani-García, M., Mori, K., Salinas-Torres, D., Kuwahara, Y., & Yamashita, H. (2019). "New approaches toward the hydrogen production from formic acid dehydrogenation over pd-based heterogeneous catalysts". *Frontiers in Materials*, 6(March), 1–18. doi.org/10.3389/fmats.2019.00044
- Peña, J., Cardona, E., & Rios, L. (2008). "Synthesis of silicon oxide with high superficial area and porosity through sol-gel technique using glycerol and glyceryl monostearate as templates". *DYNA (Colombia)*, 75(156), 207–216.
- Popova, M., Lazarova, H., Szegedi, A., Mihályi, M. R., Rangus, M., Likozar, B., & Dasireddy, V. D. B. C. (2018). "Renewable glycerol esterification over sulfonic-modified mesoporous silicas". *Journal of the Serbian Chemical Society*, 83(1), 39–50. doi.org/10.2298/JSC170306071P
- Vaschetto, E., Ferrero, G. O., Carrillo, G., Pérez-Pariente, J., & Eimer, G. A. (2021). "Diseño, síntesis y caracterización de sílicas mesoporosas nanoestructuradas a partir de moldeantes renovables para su aplicación en la degradación de glifosato". Actas del VIII Congreso Internacional Internacional Y XVII Congreso Mexicano de Catálisis, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. 7 al 12 de noviembre del 2021, 407-412.