

Optimización del proceso de esterificación química del destilado de desodorización del aceite de soja previamente saponificado y acidulado

Por Nara Lúcia Facioli y Daniel Barrera-Arellano*

Laboratório de Óleos e Gorduras – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) –
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6091, CEP 13083-970,
Campinas, SP, Brazil.
E-mail: daniel@fea.unicamp.br

RESUMEN

Optimización del proceso de esterificación química del destilado de desodorización del aceite de soja previamente saponificado y acidulado.

En esta investigación fueron optimizadas las condiciones de reacción de esterificación de la materia saponificable del destilado de desodorización del aceite de soja. El proceso engloba (i) hidrólisis alcalina de la materia saponificable; (ii) acidulación de los jabones y (iii) esterificación catalizada por ácido de los ácidos grasos totales resultantes. Las condiciones óptimas del proceso, para obtener el mayor rendimiento en ésteres etílicos y pérdidas mínimas de tocoferoles, fueron determinadas usando la metodología de superficie de respuesta de un diseño factorial completo de 2^o orden. Etapa (i) saponificación de la materia saponificable del destilado de desodorización del aceite de soja, usando: relación molar etanol:ácidos grasos totales = 2:1, temperatura = 80°C y tiempo de reacción = 40 minutos. Etapa (ii) los jabones formados fueron rápidamente convertidos en ácidos grasos libres utilizando ácido sulfúrico (23%), con exceso molar del 50%, a 80°C, durante 40 minutos a presión atmosférica. Etapa (iii) las condiciones óptimas para la reacción de esterificación del destilado de desodorización del aceite de soja saponificado y acidificado fueron: relación molar etanol:ácidos grasos totales de 6.4 al 11.2:1, concentración de H₂SO₄ de 0.9 a 1.5% y tiempo de reacción de 1.3 al 2.6 h, obteniendo así rendimientos superiores al 98% de ésteres etílicos. El modelo matemático propuesto mostró ser predictivo y significativo estadísticamente ($p < 0.05$). Durante el proceso las pérdidas de tocoferoles totales fueron menores de 10,5%.

PALABRAS-CLAVE: Acidulación - Destilado de desodorización - Ésteres etílicos - Esterificación - Saponificación - Tocóferoles.

SUMMARY

Optimization of chemical esterification process of saponificated and acidulated soybean oil deodorizer distillate.

In this research work, it was optimized the reaction conditions for the chemistry esterification of unsaponifiable matter in soybean oil deodorizer distillate. The process involves (i) alkaline hydrolysis of saponifiable matter; (ii) acidulation of soaps and (iii) acid catalyzed esterification of resulting total fatty acid. To determine the best process conditions to get the higher conversion rates of total fatty acids to ethylic esters, preserving the tocopherols, it was used, to analyze the results, the response surface methodology in a 2nd order factorial planning. In the step (i) saponification of soybean oil deodorizer distillate saponifiable matter using NaOH:total fatty acids molar ratio = 2:1, temperature = 80°C and reaction time of 40 min. In the step (ii) the resulting

soaps were rapidly and stoichiometrically converted in free fatty acids with sulfuric acid (23%), using an acid molar excess of 50%, at 80°C, for 40 min and under atmospheric pressure. In the step (iii) the optima conditions for the esterification reaction of soybean oil deodorizer distillate were: ethanol:total fatty acids molar ratio from 6.4 to 11.2:1, H₂SO₄ concentration from 0.9 to 1.5% and reaction time from 1.3 to 2.6 h, with ethyl esters conversion rates up to 98%. The mathematical model obtained is predictive and statistically significant ($p < 0.05$). The total tocopherol losses during the process were less than 10,5%

KEYWORDS: Acidulation - Deodorizer distillate - Ethyl esters - Esterification - Saponification - Tocopherols.

1. INTRODUCCIÓN

Además de la continua y creciente tendencia mundial de utilización de compuestos e ingredientes naturales, ya sea en la industria de alimentos, como en la farmacéutica y de cosméticos, los tocoferoles y esteroides tienen una indiscutible importancia tecnológica, metabólica y nutricional. Los tocoferoles como fuente de vitamina E (Hauman, 1990) y como antioxidantes naturales (Diplock, 1994) y los esteroides, como fuente de compuestos hipocolesterolémicos (Ling and Jones, 1995) y como materia prima para la elaboración de corticoides y hormonas sexuales (Balazs, 1987).

En la etapa de desodorización de aceites vegetales, se obtiene un subproducto denominado destilado de desodorización, que representa del 0.15 al 0.45%, en peso del aceite a ser desodorizado. Este destilado está compuesto principalmente por ácidos grasos libres (AGL), esteroides, tocoferoles, mono-, di- y triglicéridos, además de productos de oxidación y otros componentes menores, siendo utilizado como materia prima para la producción de extractos y concentrados de tocoferoles y esteroides (Pryde, 1980). La obtención o concentración de estos compuestos, incluye tratamientos químicos y físicos, siendo la esterificación de sus ácidos grasos, con posterior destilación de los mismos, uno de los procesos más utilizados comercialmente (Smith, 1967). La esterificación tiene como objetivo la reducción del punto de ebullición de los ácidos grasos, facilitando

su separación de los compuestos de interés. Brokaw (1957) e (Smith, 1967) estudiaron la esterificación de la materia saponificable de destilados de desodorización, considerando tres etapas: saponificación, acidificación y esterificación. Procesos enzimáticos de esterificación de los ácidos grasos de destilados también han sido estudiados con el objetivo de obtener concentrados de tocoferoles y esteroides (Rama-murthi *et al.*, 1991).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso controlado de esterificación de la materia saponificable del destilado de desodorización del aceite de soja (DDAS), con condiciones de reacción optimizadas para obtener el máximo rendimiento en ésteres etílicos. Como las reacciones son influenciadas por varios factores (concentración de catalizador y alcohol, tiempo de proceso, impurezas y humedad presentes en el medio de reacción), fue usada la metodología de superficie de respuesta (RSM), que ofrece solución para la optimización de problemas con múltiples variables (Box, 1978; Khuri and Cornell, 1987; Barros Neto *et al.*, 1996).

2. EXPERIMENTAL

2.1. Material

Destilado de Desodorización de Aceite de Soja (DDAS)

DDAS (condiciones de desodorización: temperatura ca. 240°C; 0.4 mm Hg presión; 4 kg s⁻¹ vapor) fue donado por COCAMAR-Cooperativa de Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá Ltda. (Maringá, PR-Brasil). Presenta coloración café oscura, textura semisólida a 25°C, y 0.24% de humedad (AOCS Tb 2-64, 1995). O DDAS fue almacenado a -18°C y para su uso, fue fundido en estufa a 40°C.

Productos químicos

Todos los reactivos y solventes utilizados fueron del grado y pureza exigidos por los métodos analíticos. Padroneos de tocoferoles (α -, β -, γ - e δ -) (99%) y de esteroides [estigmasterol (90%), β -sitosterol (60%) y campesterol (40%)] fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. y Merck. El etanol absoluto usado en las reacciones de esterificación fue adquirido de Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.

2.2. Métodos analíticos

Clases de Lípidos - determinadas por HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography), según Dobarganes and Márquez-Ruiz (1993), en cromatógrafo líquido de alta eficiencia Perkin Elmer Series 10, equipado con detector de Índice de Refracción Sicon Analytic LCD 201 y de los

columnas HP PL gel 5 μ (30cm x 7,5mm), con 100 Å y 500 Å, en serie. Fase móvil tetrahidrofurano, con flujo de 1 mL/min. La cuantificación de los ácidos grasos libres, mono-, di- y triglicéridos fue realizada por normalización interna de áreas.

Composición en Ácidos Grasos - método AOCS Ce 1-62 (1993), utilizando la técnica de cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, en un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Sigma 3B, equipado con detector de Ionización de Flama Perkin Elmer y columna de acero inoxidable, HP Silar 10 C (4m x 1/8"), empaquetada con Chromosorb W-HP. Temperaturas usadas: columna a 175°C, inyector y detector a 225°C. Flujo de nitrógeno 25 mL/min. Los ésteres metílicos fueron preparados de acuerdo con Hartman & Lago (1973). Se inyectó en el cromatógrafo 1 μ L de los ésteres en hexano. La identificación de los ácidos grasos fue realizada por comparación de tiempos de retención de los componentes de la muestra con los de padrones de ésteres metílicos de ácidos grasos. La cuantificación fue efectuada por normalización interna de áreas.

Ácidos Grasos Totales - determinados por la suma de los ácidos grasos libres (AOCS Ca 5a-40,1993) con los ácidos grasos provenientes de los mono- di- y triglicéridos, determinados por HPSEC, presentes en la muestra. El peso molecular medio de los ácidos grasos fue calculado a partir de la composición en ácidos grasos del DDAS.

Composición en Tocoferoles - método AOCS Ce 8-89 (1993), utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Perkin Elmer LC 250, equipado con detector de fluorescencia Shimadzu, Merck-Hitachi F-1050, con excitación de 290nm e emisión de 330nm y columna Merck, LiChrosorb Si 60 (25 cm x 4,0 mm, 5 μ m). Fase móvil hexano:isopropanol (99:1, v/v), con flujo de 1,1 mL/min. Los tocoferoles fueron cuantificados por la relación entre el área del pico y la concentración del tocoferol respectivo, usando una curva padrón, construida usando las mismas condiciones.

Composición de Esteroides- determinada según método de Holen (1985), utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Perkin Elmer LC 250, equipado con detector espectrofotométrico UV/VIS Perkin Elmer LC 290 a la longitud de onda (λ) de 206 nm y columna Perkin Elmer C8-SIL-X-10 (25 cm x 4,6 mm). Fase móvil acetonitrilo:agua (80:20, v/v), con flujo de 1,6 mL/min. La cuantificación individual de los esteroides (β -sitosterol, campesterol y estigmasterol) fue realizada utilizando una curva padrón, construida usando las mismas condiciones.

2.3. Análisis estadístico

Diseño experimental - Inicialmente, se utilizó un delineamiento factorial incompleto para definir la re-

gión más adecuada para el estudio y confirmar la significancia de las variables independientes en la respuesta, a seguir se verificó el ajuste a un modelo de 1^{er} orden de los resultados experimentales. Si este modelo no es significativo estadísticamente para $p < 0.05$ ("F" calculado < "F" Tablado) o no es predictivo ("F" calculado < $3 \times$ "F" Tablado), se verifica entonces, el ajuste de un modelo de 2^o orden. Para el estudio de los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables independientes [relación molar etanol: Ácidos grasos totales (AGT) (X_1); concentración de H_2SO_4 (%) (X_2) y tiempo de reacción (h) (X_3)] (Tabla I) sobre la respuesta Y (% conversión de AGT en ésteres etílicos) y optimización de los resultados, fue utilizada la metodología de superficie de respuesta, obtenida mediante un delineamiento factorial completo, usando un "Central Composite Rotational Design" (CCRD) (Tabla II) con las tres variables independientes, lo que incluye 8 puntos factoriales, 3 puntos centrales (repeticiones) y 6 puntos axiales (Khuri and Cornell, 1987; Barros Neto *et al.*, 1996).

Confirmación experimental - Para confirmación experimental del modelo estadístico, los ensayos fueron realizados en las condiciones indicadas por la metodología de superficie de respuesta y comparados con los valores obtenidos mediante el modelo matemático propuesto.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Saponificación

Estudios preliminares (datos no publicados) mostraron que la saponificación en medio acuoso (agua:DDAS = 2:1, v/p) hasta por 6 horas, no es adecuada, inclusive cuando se utilizan relaciones molares NaOH:AGT (1.2; 2 y 3:1) y temperatura de 80°C.

Para la saponificación en medio alcohólico, fueron probados tres relaciones molares NaOH:AGT (1.2; 1.5 y 2:1).

En un matraz de 500mL, con agitación magnética, a 80°C de temperatura, fueron colocados 100 g de DDAS, 100 mL de etanol comercial (96%) y las cantidades seleccionadas de una solución acuosa de NaOH (50%).

3.2. Acidulación

Después de la saponificación completa de los ácidos grasos presentes en el DDAS, la mezcla de reacción fue inmediatamente acidulada agregando una solución acuosa de H_2SO_4 (23%), con exceso molar del 50%, calculado con respecto a la cantidad de NaOH adicionada en exceso en la saponificación. La mezcla fue mantenida a 80°C por 40 minutos, con agitación. La reacción fue monitorizada mediante la determinación por HPSEC de las clases lipídicas.

Tabla I
Niveles de variación (codificados) de las tres variables independientes en la esterificación de la materia saponificable del destilado de desodorización del aceite de soja (DDAS)

Variables Independientes	Niveles codificados de las variables				
	-1	-1	0	+1	+
	.68*				1.68*
Etanol: AGT (X_1)	2	4	7	1	1
H_2SO_4 (X_2)	0	0	1	1	1
Tiempo (X_3)	0	0	1	2	2
	.4	.6	.0	.4	.6
	.2	.7	.5	.3	.8

(* $\pm \alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 1.68$ (Khuri & Cornell, 1987)

X_1 : relación molar del sustrato (etanol:ácidos grasos totales del

3.3. Esterificación

Después de la acidificación, en un embudo de separación de 500 mL, fue realizada la separación desechando la fase más pesada (agua, glicerol, ácido y alcohol). La mezcla resultante y las cantidades seleccionadas de etanol anhidro y ácido sulfúrico concentrado fueron colocadas en un matraz y mantenidas sobre agitación a 80°C. Al final de cada reacción, se retiró una muestra de 5mL de la mezcla, la cual fue lavada con agua hasta la eliminación completa del ácido mineral. El exceso de humedad fue retirado en una estufa al vacío (100 mbar de presión y temperatura de 60°C durante 1.5 h). El curso de la reacción fue monitorizado por la determinación del valor ácido (VA) (AOCS Te 1a-64, 1993) del producto.

Rendimiento: La conversión de los ácidos grasos en ésteres etílicos fue determinada por medio de los valores inicial y final del valor ácido de la mezcla de reacción.

$$\text{Rendimiento} = \frac{(\text{VA inicial DDAS} - \text{VA mezcla de reacción a tiempo } t) \times 100}{\text{VA inicial DDAS}}$$

El valor ácido inicial del DDAS fue considerado 134,0 mg KOH/g de muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características químicas y de composición del DDAS son mostrados en la Tabla III. El análisis de la materia insaponificable muestra que los tocoferoles totales representan el 8,55% y los esteroides mayoritarios el 17,02%. Aquí considerando solamente: estigmasterol, campesterol y β -sitosterol. Los re-

Tabla II
Diseño experimental (niveles codificados) factorial completo con tres variables, en el proceso de esterificación de la materia saponificable del destilado de desodorización del aceite de soja (DDAS)

Ensayos ^a	Niveles codificados			Conversión (%) ^b
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	75.1 ± 0,47
2	+1	-1	-1	81.8 ± 0,75
3	-1	+1	-1	76.5 ± 0,30
4	+1	+1	-1	94.2 ± 0,44
5	-1	-1	+1	84.0 ± 0,08
6	+1	-1	+1	92.6 ± 0,27
7	-1	+1	+1	85.1 ± 0,55
8	+1	+1	+1	98.7 ± 0,61
9	-1.68	0	0	65.4 ± 0,28
10	+1.68	0	0	99.5 ± 0,69
11	0	-1.68	0	90.7 ± 0,16
12	0	+1.68	0	93.8 ± 0,52
13	0	0	-1.68	89.3 ± 0,67
14	0	0	+1.68	96.8 ± 0,51
15 (C)	0	0	0	97.9 ± 0,29
16 (C)	0	0	0	99.0 ± 0,32
17 (C)	0	0	0	98.3 ± 0,43

(^a) ensayos realizados en orden aleatorio

(^b) rendimiento (media de las determinaciones ± desvío padrón) = (valor ácido inicial DDAS - valor ácido de la mezcla en el tiempo t) x 100 / valor ácido inicial DDAS

X₁: relación molar del sustrato (etanol:ácidos grasos totales del DDAS); X₂: concentración del H₂SO₄ (sobre el peso de los sustratos); X₃: tiempo de reacción (h)

sultados muestran que el DDAS utilizado posee una calidad standard y tiene características semejantes a los reportados en la bibliografía (Winters, 1989).

La Tabla IV muestra los resultados obtenidos en función del tiempo de reacción para la saponificación en medio alcohólico.

De los resultados, se concluye que la saponificación de los lípidos presentes en el DDAS es directamente proporcional a la concentración de hidróxido

de sodio. Las pérdidas de tocoferoles fueron del 5 y 7% para reacciones con relaciones molares de 1.2 e 1.5:1 respectivamente y tiempo de 3 horas. Las condiciones de reacción de saponificación seleccionadas para pasar a la etapa siguiente de acidificación fueron: NaOH:AGT = 2:1, temperatura de 80°C y tiempo de 40 minutos, lo que puede ser observado en la Tabla IV. En estas condiciones, las pérdidas de tocoferoles fueron inferiores al 5%.

Tabla III
Composición y características principales del destilado de desodorización del aceite de soja (DDAS)

Componentes (%p/p)	DDAS
Humedad	0.24 ± 0.02
Ácidos grasos libres (como oléico)	47.55 ± 0.03
Monoglicéridos	14.18 ± 0.09
Diglicéridos	6.43 ± 0.15
Triglicéridos	5.61 ± 0.10
Materia insaponificable	26.23 ± 0.30
Tocoferoles totales	8.55 ± 0.19
α-tocoferol	1.61 ± 0.05
β-tocoferol	0.22 ± 0.07
γ-tocoferol	4.75 ± 0.03
δ-tocoferol	1.97 ± 0.04
Esteroles	17.02 ± 0.15
Campesterol	4.61 ± 0.05
Stigmasterol	3.85 ± 0.08
β-sitosterol	8.56 ± 0.02

El diseño experimental factorial completo de la reacción de esterificación de la materia saponificable del DDAS, incluyendo la conversión de los AGT en ésteres etílicos se muestra en la Tabla II.

Los efectos de las variables independientes: relación molar etanol:AGT; concentración de H₂SO₄ y tiempo de reacción sobre la conversión (respuesta Y), están descritos en la Tabla V. Fueron excluidos del análisis los efectos de interacción de la relación molar etanol:AGT y de la concentración de H₂SO₄ con el tiempo de reacción, ya que no son estadística-

mente significativos ($p > 0.05$). Se puede observar que todas las variables, como términos lineales, ejercen un efecto positivo sobre la respuesta, o sea, el aumento del valor de las variables se refleja en un aumento del rendimiento en ésteres. La variable que tiene menor efecto (3.84) sobre la conversión es la concentración de ácido, entre el 0.4 y el 1.6%.

Los coeficientes de regresión (Tabla V), obtenidos a través de procedimientos estadísticos, fueron usados para obtener la siguiente ecuación polinómica (modelo codificado) de segundo orden:

$$Y = 98.6 + 7.61X_1 + 1.92X_2 + 3.32X_3 - 6.24X_1^2 - 2.77X_2^2 - 2.48X_3^2 + 2.00X_1X_2 + 0.31$$

(modelo codificado)

La comprobación y certificación del modelo fue determinada mediante el análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta Y (Tabla VI). Fue observada una excelente reproducibilidad de los resultados, pues el error puro es muy bajo (0,620), representando el 0.04% del total de la fuente de variación. El porcentaje de variación explicada alrededor de la media ($R^2 = 92.6\%$) es alto, lo que indica una baja variabilidad ($R^2 > 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996) y correspondiendo a un coeficiente de correlación (R) de 0.96 entre las respuestas obtenidas experimentalmente y los valores previstos por el modelo de 2º. orden encontrado, indicando una excelente correlación entre los mismos, a un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$). Los residuos son explicados casi exclusivamente por la falta de ajuste del modelo, que representa aproximadamente el 7,3% del total de la fuente de variación. Usando el Teste "F", fue confirmado que la ecuación de regresión es estadísticamente significativa y predictiva, pues el "F" calculado (16.2) es 4.9 veces mayor que el "F" de la tabla ($F_{0.95; 9; 7} = 3.68$) (Barros Neto *et al.*, 1996).

Tabla IV

Evolución de la materia saponificable durante la saponificación del destilado de desodorización del aceite de soja en medio alcohólico y relaciones molares NaOH:ácidos grasos totales de 1.2, 1.5 y 2.0

Relação Molar (NaOH:AG)	1.2			1.5			2.0		
	TG + DG	MG	AG	TG + DG	MG	AG	TG	DG	AG + MG
0	16.7	23.0	60.5	16.7	23.0	60.5	9.5	7.2	83.5
30	15.5	20.0	64.5	2.6	12.0	85.0	0	6	94.0
40	--	--	--	--	--	--	--	3.9	96.2
60	5.6	17.0	77.4	0	13.5	86.5	--	1.7	98.3
120	3.2	15.0	81.8	--	11.3	88.7	--	--	--
180	3.2	12.0	84.8	--	7.7	92.3	--	--	--

TG = Triglicéridos; DG = Diglicéridos; MG = Monoglicéridos; AG = Ácidos grasos

Tabla V
Análisis de los efectos significativos estimados de las tres variables como términos lineales (L), cuadráticos (Q) y de interacción sobre la conversión de ácidos grasos en ésteres etílicos, para un modelo de segundo orden ($R^2 = 92,6\%$) ($p < 0.05$)

Variables	Efectos	Coefficientes de regresión
Media	98.6	98.6
(1) Etanol:AGT	15.2	7.61
(L)	3.84	1.92
(2) H ₂ SO ₄ (L)	6.65	3.32
(3) Tiempo (L)	-12.5	-6.24
Etanol:AGT (Q)	-5.54	-2.77
H ₂ SO ₄ (Q)	-4.98	-2.48
Tiempo (Q)	4.00	2.00
1L con 2L		

La optimización de las condiciones de la reacción fue realizada mediante el análisis de las superficies (RSM) ajustadas del modelo encontrado. Los efectos de las tres variables independientes sobre la tasa de conversión de los AGT en ésteres etílicos pueden ser observados en los mapas de contorno (Figuras 1-3), los cuales fueron elaborados, manteniéndose fija una de las variables en su punto central y variando las otras dos, ratificando así, los resultados estadísticos de la Tabla IV.

En la literatura consultada, no fue encontrado ningún dato sobre rendimiento en ésteres para el proceso de esterificación del DDAS.

A) *Relación de los sustratos*

Un exceso molar de etanol con relación a los AGT presentes en el DDAS fue necesario para obte-

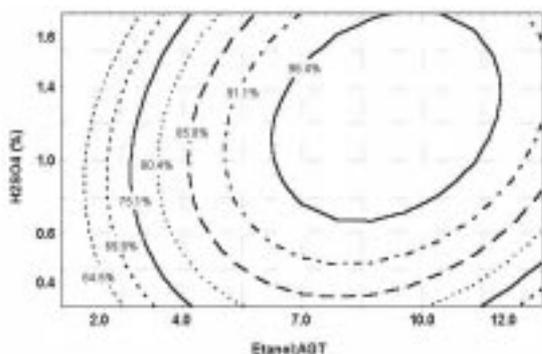


Figura 1

Mapa de contorno bidimensional mostrando el efecto de la relación molar etanol: AGT y concentración de H₂SO₄ sobre la conversión de ácidos grasos en ésteres etílicos manteniendo fijo el tiempo de reacción en 1.5 h.

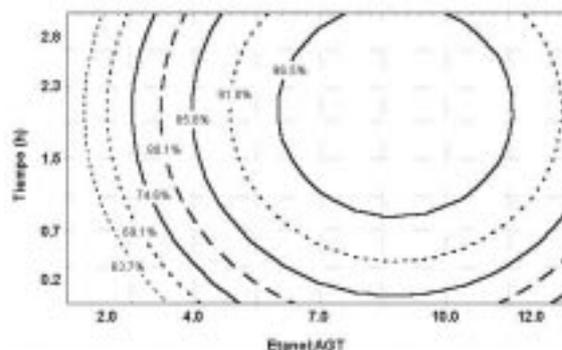


Figura 2

Mapa de contorno bidimensional mostrando el efecto de la relación molar etanol: AGT y del tiempo de reacción sobre la conversión de ácidos grasos en ésteres etílicos manteniendo fijo la concentración de H₂SO₄ en 1%

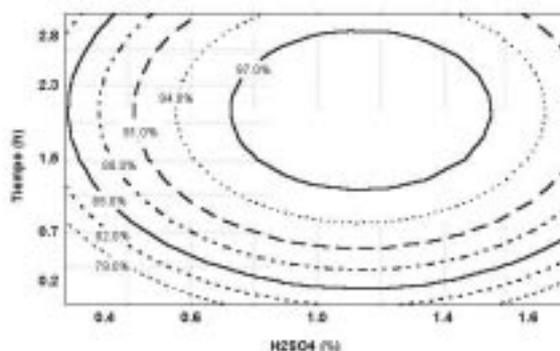


Figura 3

Mapa de contorno bidimensional mostrando el efecto de la concentración de H₂SO₄ y del tiempo de reacción sobre la conversión de ácidos grasos en ésteres etílicos manteniendo fijo la relación molar etanol: AGT en 7:1.

ner tasas de conversión (esterificación) mayores del 96.5%, siendo observado lo mismo en reacciones de esterificación de ácidos grasos con alcoholes monohídricos de bajo peso molecular, donde, para obtener rendimientos en ésteres superiores al 95%, fue necesario adicionar un exceso de alcohol de 15 a 35 veces (mol:mol) la cantidad del ácido graso (Formo, 1954). En estudios preliminares (datos no publicados), se comprobó que el aumento de la relación molar etanol:AGT de 4 para 10:1, aumentó la tasa de conversión un 11,6%. El efecto lineal positivo que la relación de los sustratos ejerce sobre la respuesta Y (15,2) puede ser observado en la Tabla V, resultando ser la variable que ejerce un mayor efecto sobre la conversión, en el intervalo de 2 a 12:1. Su efecto de interacción con la concentración de H₂SO₄ puede ser observado en la Figura 1. Si mantenemos el tiempo de reacción fijo en 1.5 horas, encontramos tres regiones donde hubo una disminución en la conversión: 1) en relaciones molares de los sustratos

Tabla VI
Análisis de varianza (ANOVA) del proceso de esterificación de la materia saponificable del destilado de desodorización del aceite de soja, para un modelo de segundo orden ($R^2 = 92,6\%$) ($p < 0.05$)

Fuente de variación	Su ma de Cuadras	Gra dos de Libertad	Med ia de Cuadras	Teste "F"
Regresión	1,476	7	210,8	16.2
Residuos	117,1	9	13,01	0.78
Falta de ajuste	116,5	7	16,64	

menores de 6.4:1; 2) por encima de 11,8:1 y 3) en concentraciones de ácido por debajo del 0,7%. Por lo tanto, los mejores rendimientos en ésteres, superiores al 96,4%, se obtienen en: relación molar etanol: AGT de 6.4 a 11.8:1, concentraciones de H_2SO_4 del 0.7 al 1.6% y tiempo de reacción de 1,5 horas.

En la Figura 2, se puede observar el efecto de interacción de los sustratos con el tiempo de reacción. Fijando la concentración del catalizador ácido en el 1%, se observa una disminución en la tasa de conversión de los AGT en ésteres etílicos en tres regiones: 1) en relaciones molares etanol:AGT por encima de 11.5:1; 2) por debajo de 6.1:1 y 3) con tiempo de reacción inferior a 54 minutos. Por lo tanto, las mejores razones de conversión fueron obtenidas con: relaciones molares etanol:AGT de 6.1 a 11.5:1, concentración de H_2SO_4 del 1% y tiempos de reacción de 0.9 a 2.8 horas.

B) Concentración de catalizador

En la Figura 3, se observa que, para una relación molar etanol:AGT fijada en 7:1, se encontraron los menores rendimientos ésteres etílicos en tres regiones: 1) con bajas concentraciones de ácido, del 0.4 al 0.7%, mismo efecto obtenido en la interacción de esta variable con la relación molar de los sustratos (Figura 1); 2) para altas concentraciones de ácido, por encima del 1.5% y 3) para tiempos de reacción inferiores a 1.2 horas. Por lo tanto, las mejores tasas de conversión, más del 97%, fueron obtenidas con relación molar etanol:AGT de 7:1, concentraciones de H_2SO_4 del 0.7 al 1.5% y tiempos de reacción de 1.2 a 2.8 horas.

Diversos autores recomiendan concentraciones entre 1 al 3% del peso del sustrato, para obtener rendimientos en ésteres superiores al 95% (Formo, 1954; Morrison and Boyd, 1992).

C) Tiempo de reacción

En estudios preliminares (datos no publicados), se observó que un aumento del tiempo de reacción de 0.7 para 2.3 horas, produjo un aumento estadísticamente significativo del 8.2% en la tasa de conversión de los AGT en ésteres etílicos. Sus efectos de interacción con la relación molar etanol:AGT (1 con 3) y con la concentración de H_2SO_4 (2 con 3) no son significativos ($p > 0.05$). A partir de las Figuras 2 e 3, llegamos a la conclusión de que el tiempo mínimo de la reacción de esterificación, para obtener el máximo de ésteres etílicos, es de 1.2 horas. Brokaw (1957) y Smith (1967) utilizaron tiempos próximos a 1 hora.

4.1. Condiciones Optimizadas

Si realizamos la intersección de los tres mapas de contorno (Fig. 1-3), podemos concluir que las mejores condiciones para la reacción de esterificación de la materia saponificable del DDAS estudiada, en valores codificados, es de -0.2 a 1.4 , para todas las variables independientes. Rendimientos superiores al 98% se pueden conseguir con tiempos de reacción entre 1.3 y 2.6 horas, relaciones molares etanol:AGT de 6.4 a 11.2 y concentraciones de H_2SO_4 del 0.9 a 1.5%.

4.2. Comprobación Experimental del Modelo Estadístico

La comprobación experimental del modelo estadístico encontrado fue realizada usando la condición más económica entre los rangos óptimos: relación molar etanol:AGT = 6.4:1, concentración H_2SO_4 = 0.9% y tiempo de reacción = 1.3 h. Experimentalmente, el rendimiento obtenido fue de 95.1%. Utilizando la ecuación de 2º grado, con los valores codificados, este rendimiento fue de 96%. Estos resultados corroboran la observación de que el modelo matemático obtenido es altamente predictivo.

5. CONCLUSIONES

La esterificación química de la materia saponificable del DDAS, vía saponificación y acidulación previas, se mostró como un proceso técnicamente viable. La reacción de saponificación fue eficiente en medio alcohólico, utilizando una relación molar $NaOH:AGT=2:1$, temperatura de $80^\circ C$ y tiempo de 40 minutos. El rango óptimo para la esterificación del DDAS (conversión de los AGT en ésteres etílicos) fue: relación molar etanol:AGT de 6.4 a 11.2:1; concentración H_2SO_4 de 0.9 a 1.5% y tiempo de reacción de 1.3 a 2.6 horas. Rendimientos superiores al 98% fueron obtenidos en estas condiciones. El modelo matemático de 2º orden propuesto, además de ser significativo estadísticamente (nivel de confianza

del 95%), es predictivo. Durante todo el proceso de esterificación de la materia saponificable del DDAS fueron observadas pérdidas de tocoferoles inferiores al 10.5%.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la "Fundación de Apoio à Pesquisa del Estado de São Paulo" (FAPESP), proyecto n° 98/15495-3 y beca de doctorado de Nara Lúcia Facioli financiada por la "Fundación de Coordinación de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES).

REFERENCIAS

- A.O.C.S. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. (1997), v.1 and 2, 4th Ed. Firestone D., AOCS Press, Champaign, IL.
- Balazs, I.L. (1987). Refining and use of byproducts from various fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1126-1128.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S. and Bruns, R.E. (1996). Planejamento e Otimização de Experimentos, p. 61-186. Editora Unicamp, Campinas, São Paulo.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics goes Experiments. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. Wiley & Sons Ed., New York.
- Brokaw, W. and Smith, F.E. Process for Separating Tocopherols and Sterols from Deodorizer Sludge and the like. Patent U.S. N° 3.153.055 (13.10.64).
- Diplock, A.T. (1994). Antioxidant and disease prevention. *Mol Aspects of the Medicine*, **15**, 293-376.
- Dobarganes, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (1993). Size Exclusion Chromatography in the Analysis of Lipids en *Advances in Lipids Methodology*, p. 113-137. The Oil Press Ltd, Scotland.
- Formo, M.W. (1954). Ester Reactions of Fatty Materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**, 548-559.
- Hartman, L. and Lago, R.C.A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, **22**, 475-476.
- Holen, B. (1985). Rapid separation of free sterols by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 1344-1346.
- Hauman, B.F. (1990). Antioxidants: Firms seeking products they can label as natural. *Inform*, **1**, 1002-1009.
- Khuri, A.I. and Cornell, J.A. (1987). Response Surfaces en *Design and Analyses*. Marcel Dekker Ed., New York.
- Ling, W.H. and Jones, P.J.H. (1995). Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats. *Atherosclerosis*, **118**, 319-331.
- Morrison, R.T. and Boyd, R. (1992). Carboxylic Acids en *Organic Chemistry*, cap.19, p.713-752, 6ª. Ed. Prentice Hall International Inc., London.
- Pryde, E.H. (1980). Composition of Soybean Oil en *Handbook of Soy Oil Processing and Utilization*, p. 13-33. Ed. WING-AOCS, Champaign, IL.
- Ramamurthi, S., Bhirud, P.R. and McCurdy, A.R. (1991). Enzymatic methylation of canola oil deodorizer distillate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 970-975.
- Smith, F. E. (1967). Separation of tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like. Patent U.S. N° 3.335.154 (08.08.67).
- Winters, R.L. (1989). Basic Principles and Modern Practices en *Proceedings World Conference Edible Fats and Oils Processing*, p. 186-238. Erickson D.R., AOCS Press, Champaign, IL.

Recibido: Abril 2001
Aceptado: Julio 2001