

FRACCIONAMIENTO Y DESMETALIZACIÓN BIOCATALÍTICA DE ASFALTENOS DE CRUDO CASTILLA

L. I. MOGOLLÓN*, R. RODRÍGUEZ, W. LARROTA, C. ORTIZ y R. TORRES*

Ecopetrol - Instituto Colombiano del Petróleo. A.A. 4185. Bucaramanga, Santander, Colombia.
e-mail: rtorres@infantas.ecp.com; e-mail: lmogollo@infantas.ecp.com

Se fraccionaron asfaltenos obtenidos a partir de crudo Castilla mediante cromatografía de adsorción en sílica gel. Estos asfaltenos se caracterizaron parcialmente mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrofotometría UV-visible y absorción atómica para analizar contenido de Ni y V. Se determinaron los contenidos de petroporfirinas y los pesos moleculares promedio de los asfaltenos fraccionados. Los resultados indicaron que el Ni y el V no se distribuyen uniformemente en las fracciones de asfaltenos. En solventes acuosos y orgánicos se evaluó la modificación biocatalítica de las petroporfirinas utilizando la enzima cloroperoxidasa (CPO). Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en soluciones acuosas tamponadas y en sistemas ternarios de tolueno:isopropanol:agua, utilizando petroporfirinas como sustrato. Las petroporfirinas fueron mucho más solubles en los sistemas ternarios que en los sistemas acuosos tamponados. La cloroperoxidasa fue efectiva en eliminar el pico de Soret de las petroporfirinas en ambos sistemas de reacción. Se determinaron también los efectos de las reacciones llevadas a cabo por CPO sobre la remoción de metales complejados con las petroporfirinas y los asfaltenos. La cloroperoxidasa fue capaz de alterar los componentes de las fracciones pesadas del petróleo y remover los metales pesados Ni y V de las fracciones ricas en petroporfirinas y asfaltenos, en un 57% y 23%, respectivamente.

Asphaltenes obtained from a crude oil rich in heavy metals (Castilla crude oil) were fractioned by adsorption chromatography. These asphaltenes were partially characterized in order to determine Ni and V content by High pressure liquid chromatography (HPLC), UV-visible spectroscopy and atomic absorption. Petroporphyrin contents and molecular weight in the fractions were also determined. The results indicated that Ni and V were not uniformly distributed in asphaltene fractions. Biocatalytic modifications by chloroperoxidase (CPO) of these petroporphyrins were evaluated in both aqueous buffer and organic solvents. The reactions were carried out in both aqueous buffers and ternary systems of toluene:isopropanol:water with petroporphyrins as substrate. The petroporphyrins were more soluble in the ternary system than in the aqueous buffer systems. CPO-mediated reactions were effective in eliminating the Soret peak in both aqueous and organic solvent systems. The effect of CPO-mediated reaction on the release of the metals complexed with the porphyrins and asphaltenes was determined. Chloroperoxidase was able to modify components in the heavy fractions of petroleum and remove 57 % of total heavy metals (Ni and V) and 23 % of asphaltenes from petroporphyrin-rich fractions.

Palabras claves: Asfaltenos, cloroperoxidasa, modificación biocatalítica, solventes orgánicos, demetalización..

* A quien debe ser enviada la correspondencia

INTRODUCCIÓN

El petróleo está formado por una amplia variedad de compuestos orgánicos de gran complejidad. Entre estos se encuentran los asfaltenos, macromoléculas de alto peso molecular insolubles en n-pentano (Strauz *et al.*, 1992), y constituidas por compuestos aromáticos y alifáticos, heteroátomos (N,S,O) (Strauz *et al.*, 1992, Waldo *et al.*, 1991) e iones metálicos (Fish *et al.*, 1984).

Se observa en general que para un tipo determinado de petróleo, la fracción de asfaltenos está formada por moléculas de estructura similar, variando principalmente en su peso molecular (Semple *et al.*, 1990). Sin embargo, existe evidencia de que las estructuras químicas y el valor promedio de las estructuras moleculares pueden variar de forma considerable con sus tamaños. Por ejemplo, los metales pesados no están uniformemente distribuidos en los asfaltenos, encontrándose mayores concentraciones de vanadio en fracciones de asfaltenos de bajo peso molecular (Filby and Van Berkel, 1987).

En la fracción asfáltica se destacan las petroporfirinas, moléculas comunmente asociadas a los asfaltenos. Las porfirinas son anillos pirrólicos derivados de un complejo básico: las porfinas. En estas moléculas se encuentra la mayor parte del nitrógeno presente en el crudo, y se cree que ellas proceden de la degradación de las clorofilas. Estas moléculas de porfirinas se encuentran formando complejos con metales pesados tales como Ni y V (Yen, 1975, Fish *et al.*, 1984).

Se ha demostrado que algunos microorganismos pueden degradar n-alcanos, isoprenoides, hidrocarburos poliaromáticos (Cerniglia, 1992) y sulfuros heterocíclicos (Finnerty *et al.*, 1983) y que se asocian a los bitúmenes que poseen fracciones con altas concentraciones de asfaltenos (Rontani *et al.*, 1985; Premuzic, *et al.*, 1994). No obstante, existen pocas evidencias de que los microorganismos o procesos bioquímicos puedan modificar los asfaltenos.

Se ha observado además que las fracciones de asfaltenos de mayor peso molecular son especialmente proclives a formar compuestos más insolubles que las fracciones de menor peso molecular (Ignasiak *et al.*, 1983). Estas diferencias en reactividad química y solubilidad sugieren que algunas fracciones de asfaltenos, como las petroporfirinas, pueden ser más susceptibles al ataque enzimático o microbiano (más

biodisponibles) que otras fracciones asfálticas (Semple *et al.*, 1990).

En este trabajo se evalúa la factibilidad tecnológica de remoción biocatalítica (mediante la utilización de enzimas) de los metales pesados Ni y V, desde las fracciones asfálticas de crudo Castilla y su potencial realización en el crudo.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la Figura 1 se muestra un diagrama de bloques de las actividades experimentales desarrolladas.

Caracterización del residuo pesado resultante del proceso de desasfaltado

Preparación de los asfaltenos

Se utilizó crudo Castilla con un contenido aproximado de asfaltenos del 25%. Los asfaltenos se prepararon mediante precipitación con n-hexano (Merck) durante una hora bajo reflujo con una proporción hexano:crudo de 40:1.

Posteriormente, se dejó reposar la solución durante 15 horas en oscuridad. Los asfaltenos sedimentados se colectaron por filtración (filtro cuantitativo, Whatman No. 42) y fueron lavados en una columna Soxhlet para remover resinas y aromáticos. Los asfaltenos aislados mediante este procedimiento, se secaron para remover todo el solvente remanente y se guardaron en una cámara con desecación para su posterior utilización.

Microscopía electrónica de barrido y análisis elemental de rayos X característicos (SEM-EDX)

Se realizaron análisis del grado de pureza de los asfaltenos y composición relativa de los metales níquel y vanadio. Los análisis se efectuaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM), Cambridge Instruments Stereoscan 240, equipado con un detector de rayos X LINK AN 10.000. Cuando se estimó necesario se llevaron a cabo detecciones semicuantitativas de níquel y vanadio, utilizando el análisis elemental de rayos X característicos (EDX).

Fraccionamiento de asfaltenos y obtención de fracciones ricas en contenido de níquel y vanadio.

La obtención de una fracción rica en metales se

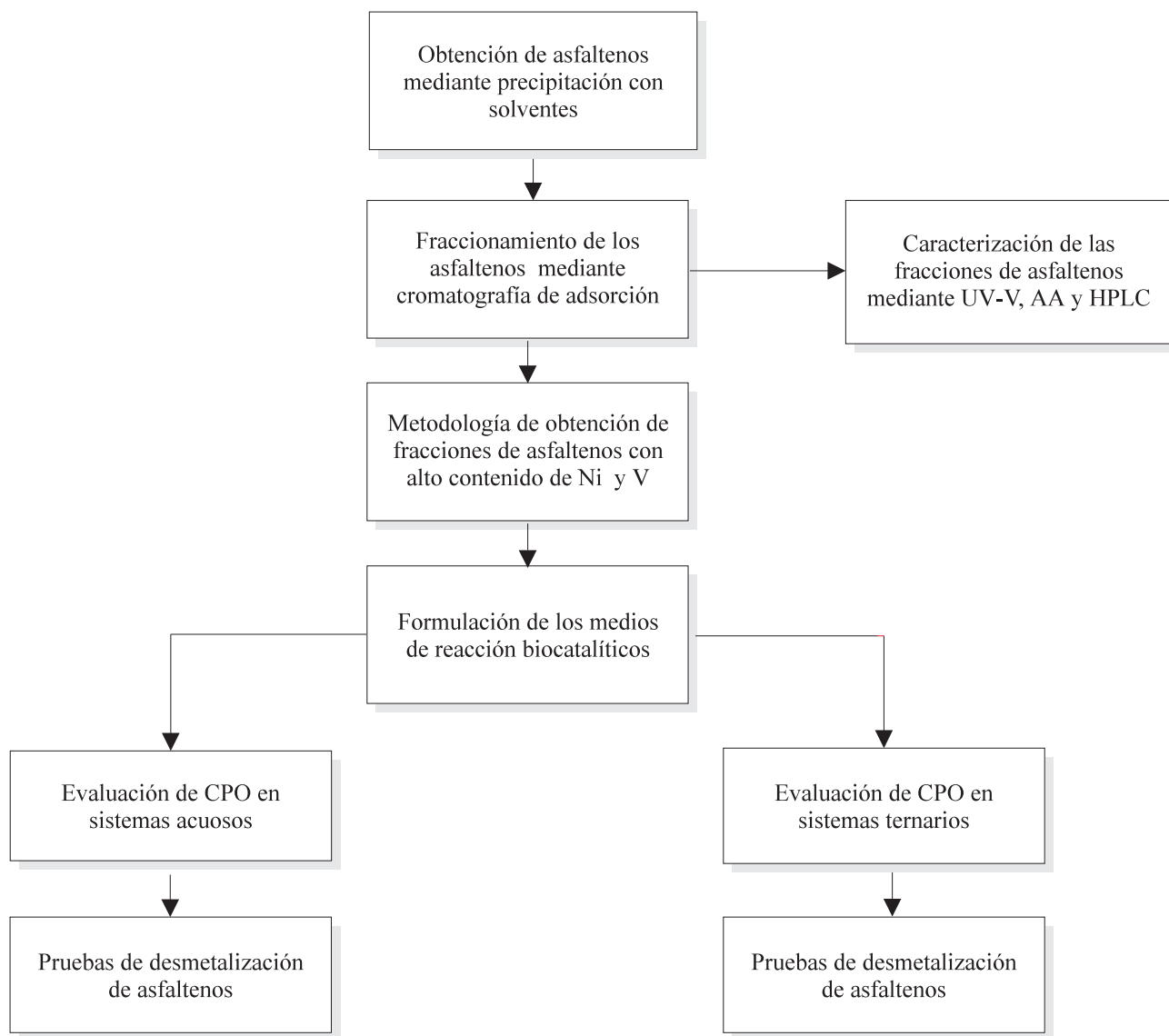


Figura 1. Metodología utilizada para los estudios de fraccionamiento y remoción biocatalítica de Ni y V a partir de asfaltenos

llevó a cabo utilizando la técnica de cromatografía de adsorción en una columna de $0,50 \times 0,025$ m, empacada con silica gel 70 - 230 mesh (Merck), activada a 493 K (220 °C) por 15 horas y cloroformo como eluyente (Merck). Se trabajó con 2,5 gramos de muestra y un flujo de elución de cloroformo de $90 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Se obtuvieron seis fracciones enumeradas F-1 hasta F-6, las cuales se analizaron mediante espectrofotometría UV-Visible para determinar contenido de porfirinas, absorción atómica para metales y HPLC para PM promedio.

En todos los casos, el solvente de cada fracción

fue removido a un volumen mínimo utilizando un evaporador rotatorio (Büchi). Luego, las muestras se transfirieron en viales mediante su disolución en un volumen mínimo de diclorometano, se secaron bajo atmósfera de nitrógeno, se pesaron y se guardaron en cámara desecadora para su análisis posterior. Para el tratamiento enzimático se utilizaron las mezclas de las fracciones F-5 y F-6.

Análisis de fracciones de asfaltenos obtenidas mediante cromatografía de adsorción.

Determinación de peso molecular de las

fracciones colectadas mediante GPC-HPLC.

Las fracciones obtenidas de la columna de sílica gel se analizaron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) asociada a HPLC. En este método se usaron tres columnas (100, 500 y 10.000 Å) en serie de poliestireno/divinilbenceno (Polymer Laboratorie) con una dimensión de 0,30 m * 0,0078 m. Para la elución de los asfaltenos se utilizó un equipo de HPLC Perkin Elmer Series 410 UV, Modelo LC-95, con un detector UV a 254 nm, y como eluyente diclorometano. Los asfaltenos se disolvieron en diclorometano a una concentración de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Se trabajó con un volumen de inyección de muestra de 10 µl, un flujo del solvente de $90 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ presión de la bomba de 13,78 Mpa (2.000 psi) y temperatura ambiente.

La relación entre el tiempo de elución y el peso molecular aparente se calculó utilizando nueve estándares de poliestireno monodisperso (Perkin-Elmer), tolueno (Merck) y benceno (Merck). El tiempo de elución del pico de las fracciones de asfaltenos se comparó con la curva de calibración y se determinó un peso molecular (PM) promedio.

Análisis por espectrofotometría UV-visible.

Se realizaron espectros UV-visible (200 a 600 nm) de fracciones de asfaltenos obtenidas en el proceso de cromatografía de adsorción en sílica gel y en las reacciones enzimáticas, utilizando un espectrofotómetro Varian Cary 1E. La presencia de petroporfirinas se detectó por la presencia de un pico a $\sim 410 \text{ nm}$ (pico de Soret) (Semple *et al.*, 1990).

Se hicieron análisis semicuantitativos de porfirinas en asfaltenos durante el proceso de cromatografía de adsorción en el rango donde la relación entre absorbancia y concentración fuera lineal (curva de calibración). Las alturas de los picos se midieron usando la línea base extrapolando desde el valor mínimo de cada lado del pico. Las alturas de los picos (ΔA) se convirtieron a valores de absorbancia por mg de la muestra original. La cantidad de petroporfirina ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) en cada fracción se estimó usando los valores previamente reportados de coeficiente de extinción molar para petroporfirinas puras y en cloroformo (Semple *et al.*, 1990). Se usó un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 4,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para cuantificar las petroporfirinas a 410 nm. La concentración estimada como partes por millón ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) se estimó usando un peso molecular

aproximado de las porfirinas de $600 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (vanadio octaetilporfirina).

Análisis de metales pesados en asfaltenos y fracciones de asfaltenos. Los análisis de níquel y vanadio se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 5.100 PC utilizando la metodología descrita a continuación:

Análisis en asfaltenos sólidos. Las muestras fueron extraídas mediante digestión ácida de acuerdo con estándares propuestos en el laboratorio de química analítica (Sección de Absorción Atómica) del ICP.

Análisis de metales en fase acuosa. Se realizaron tomando muestras de la fase acuosa de las reacciones enzimáticas y se analizaron de acuerdo con los métodos estándares propuestos en el laboratorio de química analítica (Sección de Absorción atómica) del ICP.

Reacciones de modificación biocatalítica de fracciones de asfaltenos en medio acuoso utilizando cloroperoxidasa.

Las reacciones de modificación se realizaron utilizando cloroperoxidasa (CPO, EC 1.11.1.10) de *Caldariomyces fumago* (6250 U) de Sigma. Se utilizó un volumen de reacción de 2 cm^3 con la fracción de asfaltenos rica en metales (contenido de petroporfirinas $> 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, siguiendo la metodología descrita por Fedorak *et al.* (1993). Para mejorar las propiedades de transferencia de masa en las mezclas de reacción se trabajó con dispersiones de asfaltenos en fase acuosa, logradas mediante la adición del surfactante no-iónico tritón X-100 a una concentración de $2 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (20 ppm). Se estudiaron dos tipos de reacciones enzimáticas: con y sin tritón X-100.

La mezcla de reacción contenía: fracción de asfaltenos rica en metales, $\text{KCl } 9 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$ en tampón KH_2PO_4 $3 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$ de pH 3,0. Para las reacciones enzimáticas se añadió H_2O_2 ($10 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$) para obtener una relación de $1,36 \mu\text{g H}_2\text{O}_2$: μg de proteína en la mezcla de reacción, con una concentración final de H_2O_2 de $0,3 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$. En este caso se estudiaron dos diferentes cantidades de fracción de asfaltenos (25 y $50 \cdot 10^{-6} \text{ g}$).

Además, se desarrolló una estrategia de reacción

de múltiples adiciones de H_2O_2 y CPO, las que se realizaron a intervalos de 10 min. Se hicieron ensayos de reacción con CPO utilizando una adición (designada como 1X) o tres adiciones (designadas como 3X) de CPO. Se trabajó para ambos casos con 3 diferentes concentraciones finales de CPO ($1,5$; $3,75$ y $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) y con H_2O_2 para reducir el pico de Soret.

Los tubos de reacción se dispusieron en un Roller (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a temperatura ambiente, de modo que fueran rotados en su eje vertical. Los controles incluyeron tratamiento con CPO sin H_2O_2 y con H_2O_2 sin CPO. Para detener la reacción enzimática se utilizaron 2 cm^3 de diclorometano para extraer las petroporfirinas. Esta fase orgánica se diluyó en un factor de 1:2 y se transfirió a una cubeta para determinar los cambios en su espectro UV-visible.

Reacciones preliminares de modificación biocatalítica de fracciones de asfaltenos en sistemas ternarios (microemulsiones)

Los experimentos iniciales se realizaron en sistemas ternarios utilizando el sistema tolueno:isopropanol:agua de acuerdo con Fedorak *et. al.* (1993). Las mezclas estudiadas aparecen en la Tabla 1. Se utilizaron cinco mezclas, caracterizadas por ser microemulsiones claras y efectivas para el tratamiento enzimático. Se eligió la mezcla No.1 como mezcla control para ensayos con CPO sobre las fracciones de asfaltenos. Esta mezcla fue utilizada por Fedorak *et. al.* (1993) para medir la capacidad de modificación de petroporfirinas de CPO sobre octaetilniquelporfina (NiOEP).

Para efectuar la reacción se disolvieron los asfalte-

nos en tolueno y se añadieron a la mezcla los disolventes isopropanol + tampón fosfato hasta obtener una concentración final de $12,5$ y $25 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ de volumen total. La porción acuosa estaba formada por tampón fosfato $3 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$ de pH 3,0, con $12 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$ de KCl en el medio de reacción. La cantidad de tampón añadido a las mezclas de reacción se disminuyó en una proporción de $0,01 \text{ cm}^3$, para evitar que la razón final de la fase acuosa se alterara en el momento de adicionar el H_2O_2 y la CPO.

El isopropanol se agregó al final y se agitó la mezcla para asegurarse que se formara una microemulsión clara. La mezcla de reacción se completó agregando CPO y H_2O_2 de concentraciones finales de $1,25 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ y $0,5 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$, respectivamente. La reacción enzimática se siguió por la disminución del pico de Soret en el tiempo, midiendo la absorbancia de manera continua. Los controles incluyeron tratamiento con CPO sin H_2O_2 y con H_2O_2 sin CPO.

Reacciones de desmetalización de asfaltenos con CPO en sistemas ternarios a escala de laboratorio.

Se llevaron a cabo pruebas de desmetalización aumentando la masa de asfaltenos y utilizando solamente la mezcla No. 5, que resultó ser la mejor mezcla en las pruebas preliminares de desmetalización en los sistemas ternarios estudiados (datos no mostrados). Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 1000 cm^3 y se distribuyeron las porfirinas disueltas en diclorometano en los matraces Erlenmeyer, dejando secar a temperatura ambiente.

Tabla 1. Composición de los sistemas ternarios utilizados en las reacciones preliminares de modificación de asfaltenos fraccionados.

MEZCLA	Porcentaje de composición por volumen		
	Tolueno	Isopropanol	Agua
1	20,7	64,9	14,4
2	30,0	55,0	15,0
3	5,0	75,0	20,0
4	20,0	60,0	20,0
5	15,0	60,0	25,0

La concentración de asfaltenos fue de $50 - 60 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ con una masa total de $10 - 12 \cdot 10^{-3} \text{ g}$.

Los residuos de asfaltenos secos en los matraces se disolvieron en tolueno y luego en volúmenes apropiados de isopropanol y tampón fosfato hasta un volumen total de 200 cm^3 . El H_2O_2 se añadió a una concentración final de $0,5 \text{ moles} \cdot \text{m}^{-3}$ y CPO a una concentración final de $1,25 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, en estrategia de adición de 10(X) a intervalos de 10 minutos. El progreso de la reacción se siguió por espectrofotometría UV-visible para evaluar la desaparición del pico de Soret y la completa remoción del pico a 435 nm . Un blanco de extracción consistió en un sistema ternario sin porfirina y controles con CPO solo y H_2O_2 solo en cada experimento.

Al final de la reacción, se agregaron 400 cm^3 de H_2O desionizada a la mezcla de reacción obteniéndose de esta manera dos fases para permitir la extracción de las porfirinas y la posterior concentración de la fase acuosa. Finalmente, se analizó el contenido de Ni y V tanto en las muestras obtenidas a partir de la fase acuosa como de la fase orgánica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del residuo pesado resultante del proceso de desasfaltado.

Microscopía electrónica. Los asfaltenos se prepararon utilizando crudo Castilla y se obtuvo un 25%

27% de asfaltenos en el crudo, luego de la precipitación con n-hexano. Los asfaltenos se caracterizaron mediante microscopía electrónica para observar su grado de pureza y un análisis preliminar del contenido y proporción de los metales Ni y V.

En las Figuras 2a y 2b, se observan microfotografías electrónicas de los asfaltenos y un análisis elemental semicuantitativo de los metales Ni y V mediante la técnica EDX, obteniéndose una relación Ni:V = 1:5,9. En el espectro tomado a los asfaltenos se observa, además, un gran contenido de azufre, heteroátomo característico en las fracciones pesadas de crudo, y encontrado en los asfaltenos provenientes del crudo Castilla.

Fraccionamiento de asfaltenos mediante cromatografía de adsorción.

Caracterización de fracciones de asfaltenos obtenidas por cromatografía de adsorción

La separación se realizó en una columna de 240 cm^3 y se caracterizaron las fracciones mediante HPLC (Peso molecular), absorción atómica (contenido Ni y V) y UV-visible (contenido de porfirinas). En las Tablas 2a y 2b se observan los resultados obtenidos al fraccionar los asfaltenos con cloroformo, como fase móvil, y sílica gel como soporte. En la Tabla 2a aparece el contenido de petroporfirinas en las fracciones de asfaltenos obtenidas mediante cromatografía de adsorción en sílica gel.



Figura 2a. Microfotografía electrónica de asfaltenos obtenidos a partir de crudo Castilla

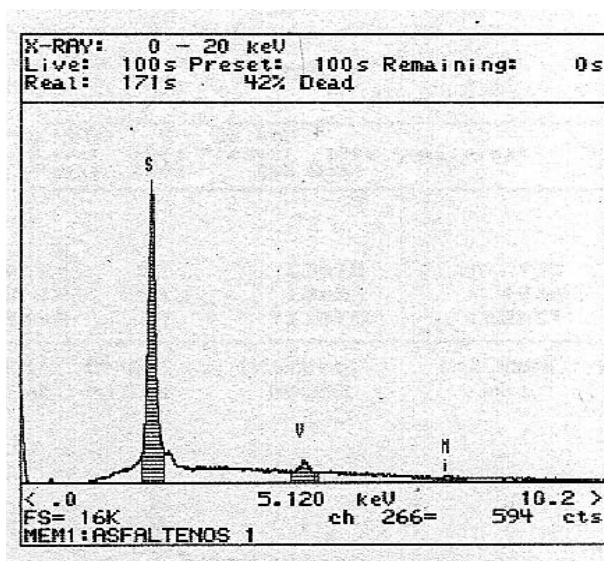


Figura 2b. Espectro de Rayos X para análisis elemental característico de metales en los asfaltenos obtenidos a partir de crudo Castilla.

Las petroporfirinas fueron cuantificadas por medición del pico de Soret ~ 410 nm. Aproximadamente el 65% de las petroporfirinas contenidas en los asfaltenos se concentró en las fracciones 5 y 6, las cuales correspondieron a las de menor peso molecular y cercanas a $600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Vanadio-porfirinas), lo cual indica que la mayor proporción de las petroporfirinas está complejada con vanadio. Esta mayor composición de vanadio-

porfirinas en los asfaltenos se demostró con los análisis de absorción atómica, alcanzándose mayores concentraciones de vanadio como metal complejado en las porfirinas (Yen *et. al.*, 1975).

En la Tabla 2b se observa además el contenido de Ni y V en las porfirinas fraccionadas de los asfaltenos. Al parecer el contenido de vanadio varía en relación con la concentración de porfirinas, aumentando bastante en las fracciones ricas en porfirinas. El contenido de níquel tiende a disminuir a medida que eluye las fracciones de petroporfirinas desde la columna. Al correlacionar los datos de contenido de metales y PM se observa que el vanadio está asociado en su mayoría a las fracciones de asfaltenos de menor PM correspondientes a las porfirinas, mientras que el níquel pareciera estar asociado a moléculas de asfaltenos distintas a las porfirinas y de mayor PM (Semple *et. al.*, 1990).

Reacciones de modificación enzimática de fracciones de asfaltenos en medio acuoso.

Se seleccionó la enzima cloroperoxidasa (CPO) como biocatalizador para la remoción biocatalítica de metales pesados, ya que en ensayos preliminares, con biocatalizadores del tipo peroxidasa, se demostró buena actividad catalítica en la modificación de petroporfirinas de los asfaltenos fraccionados. Esta enzima es una halogenasa capaz de realizar reacciones de oxidación de iones cloruro a clorito en presencia de aceptores

Tabla 2a. Caracterización de las fracciones de asfaltenos obtenidas mediante cromatografía de adsorción utilizando GPC-HPLC

FRACCION	Contenido porfirina ^(a)	Distribución en asfaltenos	PM ^(b)	Masa
	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	(%)	($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	(%)
1	290	5,0	940	16,0
2	270	6,6	765	22,4
3	450	7,0	600	14,2
4	605	7,0	540	10,6
5	4900	12,8	535	2,4
6	20650	51,3	520	2,3
N.F. ^(c)	295	10,3	N.D.	32,1

(a) El contenido inicial en los asfaltenos es de $1,53 \mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}$ y $920 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

(b) Peso Molecular del pico máximo del cromatograma.

(c) Asfaltenos no fraccionados, pérdidas por masa retenida en la columna.

N.D. No determinado

N.F. No fraccionado.

Tabla 2b. Contenido de níquel y vanadio de las fracciones de asfalteno de crudo Castilla obtenidas mediante cromatografía de adsorción

FRACCION	Contenido porfirina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^(a)		V en porfirinas ^(b)	
	Ni	V	$10^{-3} \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	% ^(c)
1	543	2.071	25	1,2
2	508	1.907	23	1,2
3	513	1.937	38	2,0
4	507	1.845	51	2,8
5	458	1.755	415	23,4
6	294	4.155	1.753	42,2
No Fraccionado ^(c)	N.D.	N.D.	25	(27,2) ^(d)

(a) Contenido de metales en asfaltenos es de 1.686 y 431 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para V y Ni, respectivamente.

(b) Determinado a partir de las μmoles porfirina/g, asumiendo que un mol de V está complejoado con la porfirina.

(c) Porcentaje de V encontrado que está asociado a las petroporfirinas. En los asfaltenos es de 4,4%.

(d) El valor entre paréntesis está calculado por diferencia.

de electrones como el peróxido de hidrógeno. (Pickard, 1981 y Carmichael *et. al.*, 1985).

Al inicio se trabajó a una concentración diluida de CPO y cinco diferentes concentraciones de fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas. En las Figuras 3 y 4 se observan los resultados de las reacciones de modificación biocatalítica de petroporfirina en medio acuoso, utilizando la enzima cloroperoxidasa (CPO). Los cálculos están hechos en función de % de reducción del pico de Soret del espectro de las petropor-

firinas (Semple *et. al.*, 1990), sin adición de la cloroperoxidasa. En ella se observa que la utilización de una mayor concentración de enzima favoreció la reducción del pico de Soret ($\sim 410 \text{ nm}$) en las condiciones de ensayo estudiadas, obteniéndose una mayor velocidad de reducción cuando se utilizó una cantidad de 50 μg de fracción rica en petroporfirinas. En este caso, se observa que a cantidades mayores de 50 μg de petroporfirinas, la velocidad de reacción se mantiene relativamente constante en las condiciones del ensayo (Figura 4 y Tabla 3), debido probablemente a limitaciones en la transferencia de masa.

En la Figura 5a, se presenta, a modo de ejemplo, un espectro UV-visible típico de petroporfirinas con y sin tratamiento de CPO en sistema acuoso. Con la adición de la CPO se produjo una reducción de la medida del pico a 410 nm. Los resultados obtenidos en la fase acuosa requirieron grandes masas de proteína para reducir el peak de Soret, debido a la insolubilidad del sustrato y la baja transferencia de masa que se produce en este sistema acuoso con sustratos de naturaleza orgánica (Fedorak *et. al.*, 1993).

A partir de los resultados anteriores, se decidió estudiar el efecto de un surfactante (Tritón X-100) para reducir las limitaciones de transferencia de masa en el sistema acuoso y favorecer el ataque enzimático (Sánchez-Ferrer y García-Carmona, 1994). Sin embargo,

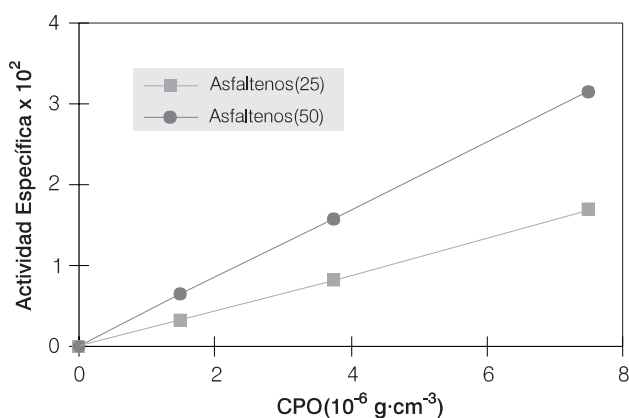


Figura 3. Efecto de la concentración de porfirinas sobre la actividad enzimática de cloroperoxidasa (CPO).
Actividad específica = $(\Delta\text{Abs}_{410} \cdot \text{gproteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$

Tabla 3. Efecto de la adición de Tritón X-100 sobre la reducción del peak de Soret en reacciones biocatalíticas de asfaltenos fraccionados en sistemas ternarios normales

ENSAYOS ^(a)	Actividad Relativa ^(b)	
	$(\Delta \text{Abs}_{410} \cdot \text{gproteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	
	Asfaltenos(25*10 ⁻⁶ g)	Asfaltenos(50*10 ⁻⁶ g)
Control	0	0
Sin Tritón X-100	1,71*10 ³	3,14*10 ³
Con Tritón X-100	1,68*10 ³	3,07*10 ³
Dispersion ^(c)	0,51*10 ²	1,80*10 ²

- (a) Se trabajó a dos concentraciones de asfaltenos en las condiciones del ensayo. Los resultados están expresados para las reacciones en que se utilizó (3X) de CPO $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$
- (b) Se determinó la velocidad en la porción lineal de variación de la curva de desaparición del peak de Soret en el tiempo.
- (c) La dispersión se realizó disolviendo los asfaltenos en Tritón X-100 para producir una solución homogénea.

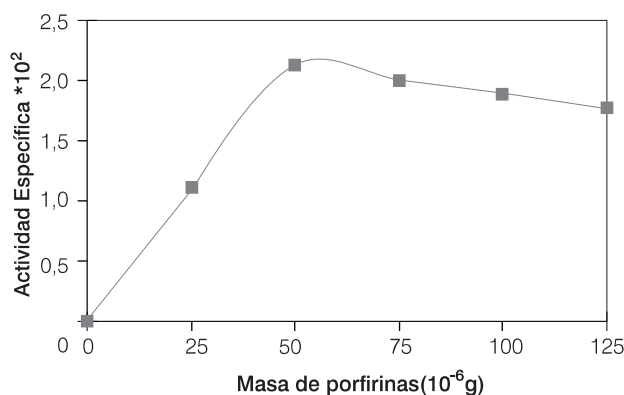


Figura 4. Efecto de la variación de la concentración de enzima sobre la reducción de peak de Soret en reacciones biocatalíticas en sistemas acuosos utilizando asfaltenos ricos en petroporfirinas

Actividad específica = $(\Delta \text{Abs}_{410} \cdot \text{gproteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$

no se observaron diferencias entre los ensayos con y sin surfactante en el sistema acuoso, indicando que las limitaciones de transferencia de masa son difíciles de superar en este caso.

Por otro lado, el uso de dispersiones de petroporfirinas en agua, mediante la adición de surfactantes, produjo una modificación muy pequeña de la cantidad de petroporfirinas. Esto es, probablemente, debido a que no se obtuvo un tamaño de partícula que permitiera una mayor área superficial disponible para llevar a cabo la reacción biocatalítica a una mayor extensión en las condiciones estudiadas en el ensayo.

Reacciones de modificación enzimática de fracciones de asfaltenos en sistemas ternarios

Con el objeto de eliminar las limitaciones de transferencia de masa en el sistema enzima-sustrato y mejorar la acción de la CPO sobre las petroporfirinas, se llevaron a cabo reacciones enzimáticas de la CPO en sistemas ternarios (Fedorak *et al.*, 1993), trabajando con los cinco mejores sistemas tolueno:isopropanol:agua (Vulfson *et al.*, 1991) obtenidos en la reducción de la banda de Soret para NiEOP en presencia de CPO y H_2O_2 . Estos sistemas se tomaron como referencia para llevar a cabo las reacciones de modificación bioca-

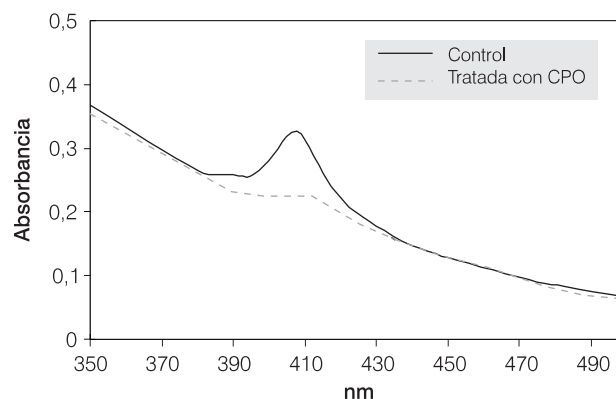


Figura 5a. Espectro UV-Visible para la fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas sin y con tratamiento con CPO en medio acuoso

Tabla 4. Reacciones de modificación biocatalítica de asfaltenos fraccionados en sistemas ternarios normales

MEZCLA ^(a)	Tolueno Isopropanol Agua ^(c) % de composición por volumen			Actividad Relativa ^(b)	
				($\Delta\text{Abs}_{410}\text{min}^{-1}\cdot\text{gproteína}^{-1}$)	
				Asfaltenos (50*10 ⁻⁶ g)	Asfaltenos(100*10 ⁻⁶ g)
1	20,7	64,9	14,4	5,36*10 ³	10,08*10 ³
2	30,0	55,0	15,0	12,56*10 ³	23,82*10 ³
3	5,0	75,0	20,0	9,24*10 ³	20,00*10 ³
4	20,0	60,0	20,0	17,56*10 ³	34,84*10 ³
5	15,0	60,0	25,0	21,72*10 ³	43,32*10 ³

(a) Se trabajó a dos concentraciones de asfaltenos y CPO (1X) en un volumen total de la mezcla de reacción de 4 cm³

(b) Se calculó en función de la desaparición del peak de Soret en el rango de relación lineal de ΔAbs_{410} v/s Tiempo de reacción.

(c) Corresponde a un tampón fosfato 3 moles·m⁻³ de pH= 3,0 con KCl 20 moles·m⁻³

talítica de las fracciones de asfaltenos ricas en petroporfirinas, ya que se caracterizaron por ser microemulsiones claras, estables y que permitieron una buena actividad biocatalítica de la CPO sobre las petroporfirinas.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en los cinco sistemas estudiados. En estos experimentos se agregó la CPO (1X) al inicio de la reacción y se monitoreó la desaparición del pico de Soret. Experimentos posteriores de remoción del pico cercano a 440 nm se realizaron añadiendo la CPO a intervalos de 3 a 4 minutos en un total de cuatro adiciones (4X), con el objeto de obtener una completa reducción del pico cercano a 440 nm y elegir el mejor sistema ternario para la remoción de Ni y V (datos no mostrados).

En la Figura 5b se muestra un espectro típico de modificación de petroporfirinas en los sistemas ternarios descritos. En este caso, a diferencia de los sistemas acuosos, la desaparición del pico de Soret fue bastante rápida, utilizándose seis veces menos cantidad de proteína para hacer la reacción enzimática de modificación de los asfaltenos. Por otro lado, la reacción de desaparición del pico de Soret se acompañó de la aparición de un pico prominente cercano a 435 nm. Este pico se removió por adiciones sucesivas de CPO + H₂O₂ a intervalos de tiempos de 2-3 minutos para el caso de las reacciones efectuadas en tubo de ensayo. En todos los casos se requirió de la presencia de iones cloruro para realizar la remoción del pico de Soret. Esto indicaría que la CPO permite la oxidación del ión cloruro para formar radicales libres de ClO⁻ en

medio ácido y realizar la destrucción selectiva de los anillos porfirínicos (Doerge, 1986; Fedorak *et al.*, 1993).

Los resultados de estas experiencias mostraron que las mayores actividades enzimáticas se alcanzaron en aquellas mezclas de reacción que contenían entre un 20% - 25% de agua y una concentración de tolueno de 15% - 20% e isopropanol alrededor de 60%, lo cual indica que, en estos rangos, se logra un compromiso entre solubilización de petroporfirinas por tolueno y buena actividad enzimática, dada por una mayor actividad de agua para las microemulsiones claras estudiadas (Vulfson *et al.*, 1991 y Fedorak *et al.*, 1993).

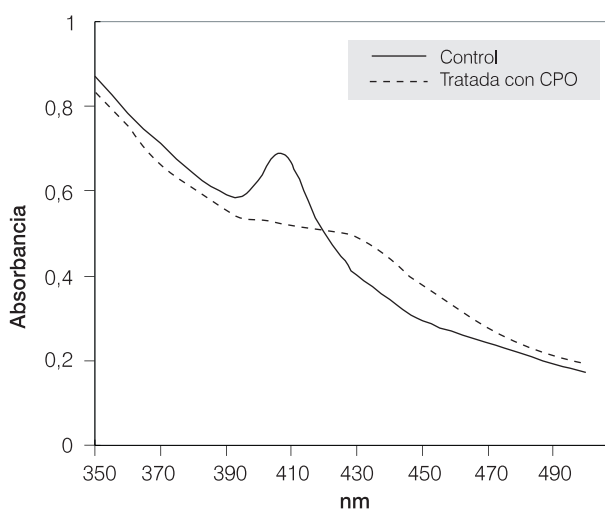


Figura 5b. Espectro UV-Visible para la fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas sin y con tratamiento con CPO (1X) en sistemas ternarios.

Experiencias de desmetalización en sistemas ternarios utilizando CPO a escala de laboratorio

En este caso se trabajó con la mezcla No.5, debido a que fue la microemulsión en la cual se obtuvieron los mejores resultados de desmetalización de Ni y V. Se trabajó con $12 \cdot 10^{-6}$ g de asfaltenos ricos en metales (porfirinas) y se realizó la experiencia a una concentración de enzima de $1,25 \cdot 10^{-6}$ g·cm⁻³ (10X).

Los resultados de estos ensayos aparecen en la Tabla 5. Se observa que los resultados confirman la remoción de metales por la vía biocatalítica, alcanzándose valores superiores al 50% de Ni y V de manera independiente y un 52,8% de remoción total de ambos metales. Estos resultados son promisorios y permiten estimar una velocidad de remoción de los asfaltenos referida a la masa de enzima de $4,1$ (g Ni*kgCPO⁻¹*h⁻¹) y $35,76$ (gV*kgCPO⁻¹*h⁻¹), y referida a la masa de los asfaltenos de $0,085$ (gNi*kgAsf⁻¹*h⁻¹) y $0,74$ (gV*kgAsf⁻¹*h⁻¹) en las condiciones de ensayo experimentales.

Posteriormente, se decidió trabajar directamente con asfaltenos obtenidos por precipitación de crudo Castilla para verificar la capacidad biocatalítica de la CPO para remover los metales pesados Ni y V. En la Tabla 6, se observan los resultados obtenidos para la experiencia de desmetalización en el sistema ternario de la mezcla

No.5. En este caso, se alcanzan menores valores de remoción de Ni y V que los alcanzados con petroporfirinas obtenidas a partir del fraccionamiento de los asfaltenos.

Con estos resultados se estimaron al igual que en el caso de petroporfirinas las velocidades de remoción de metales. Se alcanzaron las siguientes velocidades:

- Velocidad de remoción de los asfaltenos referida a la masa de enzima: $2,4$ (gNi*kgCPO⁻¹*h⁻¹) y $15,5$ (gV*kgCPO⁻¹*h⁻¹) en las condiciones del ensayo.
- Velocidad de remoción referida a la masa de los asfaltenos: $0,045$ (gNi*kgAsf⁻¹*h⁻¹) y $0,29$ (gV*kgAsf⁻¹*h⁻¹) en las condiciones de ensayo.

En consecuencia, se continuarán los estudios de modificación biocatalítica y desmetalización utilizando la CPO. Recientes trabajos indican que esta enzima es estratégica en el desarrollo de la biocatálisis, ya que exhibe actividades, además de halogenación, (Morris and Hager, 1966), de tipo peroxidasa, catalasa y citocromo - P₄₅₀, lo cual la convierte en una enzima que ocupa un nicho único entre las hemoproteínas y le abre un amplio espectro de aplicaciones (Sundaramoorthy *et al.*, 1995)

CONCLUSIONES

- La cromatografía de adsorción en sílica gel es

Tabla 5. Análisis de metales de la fracción de asfaltenos rica en contenido de metales en la mezcla No 5. Experiencias de desmetalización utilizando CPO(10X).

MUESTRA ^(a)	Cantidad de níquel				Cantidad de vanadio			
	Fase orgánica		Fase acuosa		Fase orgánica		Fase acuosa	
	10 ⁻⁶ g	%R ^(b)	10 ⁻⁶ g	%E ^(c)	10 ⁻⁶ g	%R	40 ⁻⁶ g	%E
Control sin CPO	3,0	0	0,6	20,0	28,4	0	0,2	0,7
Tratamiento con CPO (10X)	1,3	56,7	1,7	53,1	13,5	52,5	4,5	15,8
Control sin asfaltenos	N.D.		0,3		N.D.		0,2	

(a) Se utilizó una muestra de asfaltenos de $12 \cdot 10^{-3}$ g con el fin de obtener aproximadamente $32,4 \cdot 10^{-6}$ g de vanadio y $3,67 \cdot 10^{-6}$ g de níquel.

(b) %R. Porcentaje de remoción del metal desde los asfaltenos. El cálculo se basa en el contenido de níquel o vanadio en la fase orgánica control.

(c) %E. Porcentaje encontrado del metal. El cálculo se basa en el contenido de níquel o vanadio en la fase orgánica control.

N.D. No determinado

Tabla 6. Análisis de metales de asfaltenos de metales en la mezcla No 5.
Experiencias de desmetalización utilizando CPO(10X).

MUESTRA ^(a)	Cantidad de níquel				Cantidad de vanadio			
	Fase orgánica		Fase acuosa		Fase orgánica		Fase acuosa	
	10 ⁻⁶ g	%R ^(b)	10 ⁻⁶ g	%E ^(c)	10 ⁻⁶ g	%R	40 ⁻⁶ g	%E
Control sin CPO	4,3	0	0,1	2,3	18,7	0	< 0,1	< 0,5
Tratamiento con CPO (10X)	3,4	20,9	0,3	8,8	12,9	31,0	1,4	7,5
Control sin asfaltenos	N.D.		0,3		N.D.		< 0,1	

(a) Se utilizó una muestra de asfaltenos de 12×10^{-6} g con el fin de obtener aproximadamente $20,3 \times 10^{-6}$ g de vanadio y $5,2 \times 10^{-6}$ g de níquel.

(b) %R. Porcentaje de remoción del metal desde los asfaltenos. El cálculo se basa en el contenido de níquel o vanadio en la fase orgánica control.

(c) %E. Porcentaje encontrado del metal. El cálculo se basa en el contenido de níquel o vanadio en la fase orgánica control.

N.D. No determinado

efectiva para la obtención de fracciones petroporfíricas ricas en Ni y V. Este método de fraccionamiento resulta ser de gran utilidad en la caracterización de asfaltenos y en la obtención de sustratos adecuados para las reacciones de biodesmetalización.

- Los metales pesados Ni y V no se encuentran distribuidos en forma homogénea en los asfaltenos, sino que se asocian a ciertas fracciones asfálticas de bajo peso molecular.
- En las petroporfirinas de crudo Castilla el vanadio se encuentra en mayor proporción que el níquel.
- Las reacciones de desmetalización realizadas en microemulsiones indican que fracciones asfálticas de petroporfirinas ricas en contenido de metales pesados pueden ser modificadas por la enzima CPO en fase orgánica, y en presencia de iones cloruro y peróxido de hidrógeno.
- Se demostró la factibilidad técnica de desmetalizar el crudo Castilla utilizando reacciones enzimáticas. Así, la aplicación de reacciones biocatalíticas en medios no-acuosos abre una oportunidad para desarrollar técnicas de biorrefinación en el tratamiento de crudos y fracciones pesadas para la remoción de iones metálicos y otros elementos contaminantes.

REFERENCIAS

- Carmichael, R., Fedorak, P. M. and Pickard, M. A. 1985. "Oxidation of phenols by chloroperoxidase", *Bio-technology letters*, 7 (4): 289 - 294.
- Cerniglia, C. E., 1992. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Biodegradation*, 3: 351 - 368.
- Doerge, D., 1986. "Oxygenation of organosulfur compounds by peroxidases: Evidence of and electron transfer mechanism for lactoperoxidase", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 244 (2): 678 - 685.
- Fedorak P., Semple K. M., Vasquez-Duhalt R. and Westlake D., 1993. "Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes", *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 429 - 437.
- Finnerty, W. R., Schokley, K. and Attaway, H., 1983. "Microbial desulfurization and denitrogenation of hydrocarbons", in *Microbial enhanced oil recovery* (Zajic, J. E., Cooper, D.C., Jack, T. R., Kosaric, N. eds.), PennWell Books, Tulsa, Okla.: 83 - 91.
- Filby, R. H. and Van Berkel, G. J., 1987. "Geochemistry of metal complexes in petroleum, source rocks and coals: an overview", in *Metal Complexes in Fossil Fuels* (Filby, R. H., and Branthaver, J. F. eds.), American Chemical Society, Washington, D. C.: 2 - 39.
- Fish, R. H., Komlenic, J. J. and Wines, B. K., 1984. "Characterization and comparison of vanadyl and nickel com-

- pounds in heavy crude petroleum and asphaltenes by reverse - phase and size - exclusion liquid chromatography/graphite furnace atomic spectrometry", *Analytical Chemistry*, 56: 2.452 - 2.460.
- Ignasiak, T. M., Kotlyar, L., Samman, N., Montgomery, D. S. and Strauz, O.P, 1983. "Preparative gel permeation chromatography of Athabasca asphaltene and the relative polymer-forming propensity of the fractions", *Fuel*, 62: 363 - 369.
- Morris, D. R. and Hager, L. P, 1966. "Chloroperoxidase, I., Isolation and properties of the crystalline glycoprotein", *Journal of Biological Chemistry*, 241: 1.763 - 1.768.
- Pickard, M, 1981. "A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by *Caldariomyces fumago*", *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 1.298 - 1.305.
- Premuzic, E. T., Lin, M. S. and Manowitz, B, 1994. "The significance of chemical markers in the bioprocessing of fossil fuels", *Fuel Processing Technology*, 40: 227 - 239.
- Rontani, J. F., Bosser-Joulak, E., Rambeloariso, E., Bertrand, J. C. and Giusti, G, 1985. "Analytical study of Asthart crude oil asphaltene biodegradation", *Chemosphere*, 14 (9): 1413 - 1422.
- Sánchez-Ferrer A. and García-Carmona F, 1994. "Biocatalysis in reverse self assembling structures: reverse micelles and reverse vecicles", *Enzyme and Microbial Technology*, 16: 409 - 415.
- Semple, K. M., Cyr, N., Fedorak, P. M. and Westlake, D.W.S., 1990. "Characterization of asphaltenes from Colg Lake heavy oil: variations in chemical structure and composition with molecular size", *Canadian Journal of Chemistry*, 68: 1.092 - 1.099.
- Strauz, O. P., Mojelsky, T. W., Lown, E. M., 1992. "The molecular structure of asphaltene: an unfolding story", *Fuel*, 71: 1.355 - 1.363.
- Sundaramoorthy, M., Mauro, M., Sullivan, A. M., Terner, J. and Poulos, T, 1995. "Preliminary crystallographic analysis of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*", *Acta Crystallographica*, Section D51: 842 - 844.
- Vulfson, E. N., Ahmed, G., Gill, Y., Kozlov, I. A., Goodenough, P.W. and Law, B.A., 1991. "Enzyme reactions in organic solvents", *Biotechnology Letters*, 13: 91 - 96.
- Waldo, G. S., Carlson, R. M. K., Moldowan, J. M., Peters, K. E. and Penner-Hahn, J. E., 1991. "Sulfur speciation in heavy petroleum. Information from X-ray absorption near-edge structure", *Geochimica and Cosmochimica*, 55: 801 - 814.
- Yen, T. F., 1975. "Chemical aspects of metals in native petroleum", *The Role of Trace Metals in Petroleum* (Yen, T.F., de.) Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI: 1 - 30.