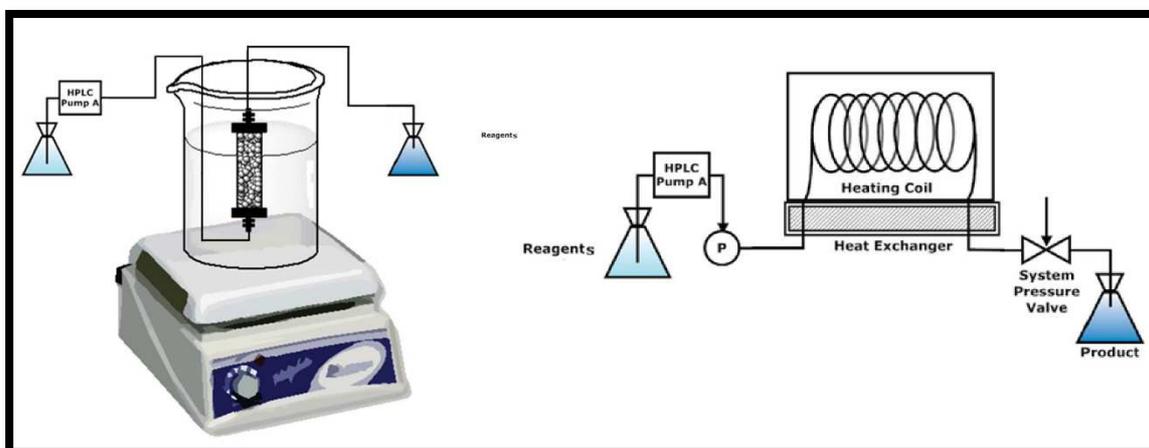


TRANSESTERIFICACIÓN DE ESTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS EN FLUJO CONTINUO



TFM

JULIO 2019

CRISTOPHER ALBERTO TINAJERO NARANJO

Supervisor: Santiago Luis Lafuente

Grupo de Química Sostenible y Supramolecular

ÍNDICE

1. Agradecimientos.....	4
2. Introducción.....	5
3. Objetivos	10
3.1. Objetivo General	10
3.2. Objetivos Específicos	10
4. Resultados y Discusión	11
4.1. Selección de productos de partida	11
4.1.1. Productos de partida	11
4.2. Pruebas iniciales en “batch”	12
4.2.1. Catalizador ácido PTSA	12
4.2.1.1. Relación molar	13
4.2.1.2. Dilución del sistema.....	13
4.2.1.3. Carga del catalizador.....	14
4.2.1.4. Temperatura.....	15
4.2.1.5. Tiempo de reacción	15
4.2.1.6. Análisis del diseño experimental	16
4.2.2. Catalizador Novozym 435	17
4.2.2.1. Relación molar	18
4.2.2.2. Dilución del sistema.....	18
4.2.2.3. Tiempo de reacción	19
4.2.2.4. Análisis del diseño experimental	19
4.2.3. Sistema sin catalizador.....	20
4.2.3.1. Dilución del sistema.....	21
4.2.3.2. Tiempo de reacción	22
4.2.3.3. Análisis del Diseño Experimental III	22

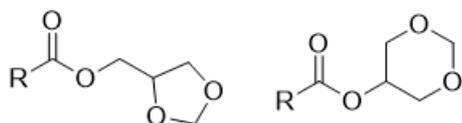
4.3. Flujo continuo	23
4.3.1. Sistema de flujo continuo I	24
4.3.1.1. Ajuste de temperatura	24
4.3.1.2. Ajuste de tiempo de residencia	25
4.3.2. Sistema de flujo continuo II	25
4.3.3. Sistema de flujo continuo III	26
4.3.4. Análisis de resultados en flujo continuo.....	27
4.4. EcoScale	27
5. Sección Experimental.....	29
5.1. Técnicas de análisis e instrumentación	29
5.1.1. Cromatografía de Gases-FID	29
5.1.1.1. Preparación de la disolución patrón	29
5.1.1.2. Preparación de muestras	29
5.1.1.3. Cálculo de la conversión	30
5.1.1.4. Método	30
5.1.1.5. Identificación de compuestos	31
5.1.2. Cromatografía de capa fina	31
5.1.2.1. Preparación de muestras	31
5.1.2.2. Condiciones de Cromatografía en capa fina	32
5.1.2.3. Preparación de patrones	32
5.1.2.4. Procedimiento experimental	32
5.1.3. Instrumento LDR	32
5.1.3.1. Procedimiento experimental	33
5.2. Procedimientos generales y datos experimentales	34
5.2.1. Diseño experimental I.....	34
5.2.2. Diseño experimental II.....	34
5.2.3. Diseño experimental III.....	34

5.2.4. Sistema de flujo continuo I	35
5.2.5. Sistema de flujo continuo II	36
5.2.6. Sistema de flujo continuo III	37
6. Conclusiones.....	39
7. Material Suplementario	40

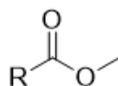
Listado de Abreviaciones

FAME	Esteres metílicos de los ácidos grasos
FAGE	Esteres de glicerol formal de los ácidos grasos
FASE	Esteres de solketal de los ácidos grasos
GlyF	Glicerol formal
MTHF	2-metiltetrahidrofurano
PTSA	Ácido p-toluensulfónico
GC	Cromatografía de gases
FID	Detector de ionización de llama
LDR	Resistencia dependiente de la luz

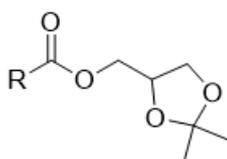
Estructuras de los Compuestos



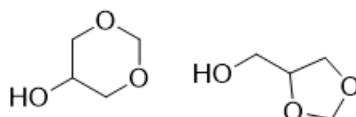
FAGE: Esteres de glicerol formal de ácidos grasos



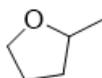
FAME: Esteres metílicos de ácidos grasos



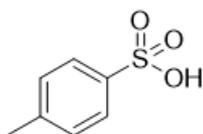
FAGE: Esteres de solketal de ácidos grasos



GlyF: Glicerol Formal



MTHF: 2-metiltetrahidrofurano



PTSA: Ácido p-toluensulfónico

1. Agradecimientos

A familia y a mi novia, por siempre creer en mí.

2. Introducción

Hoy en día, el desarrollo sostenible es parte clave en cuanto a la investigación y el desarrollo industrial; la sostenibilidad implica emplear los recursos disponibles sin privar a las futuras generaciones de su uso.¹ Puesto que los recursos fósiles no cumplen con esta característica y, adicionalmente, presentan impactos ambientales negativos, es conveniente, si no inevitable, investigar cada día alternativas renovables y de base biológica a la materia prima petroquímica.² Apoyados por los desarrollos tecnológicos y de ingeniería, se disponen ahora de los medios necesarios para realizar esta exploración.³

Un claro ejemplo de esta aproximación es el crecimiento continuo de la producción y el uso de biocombustibles neutros en carbono, como el biodiesel, el cual se ha convertido en una alternativa y un valioso aditivo a los combustibles de base fósil.⁴ Este creciente uso de biocombustibles contribuye en dos parámetros importantes en los países industrializados. En primer lugar, la reducción de la dependencia del petróleo importado y, en segundo lugar, la reducción de las emisiones relacionadas con la combustión de combustibles fósiles en los motores, con especial énfasis en el CO, CO₂, SO_x, NO_x, C y partículas, emisiones que se reducen y/o eliminan con el uso de biocombustibles.⁵

En la actualidad, la mayor parte de la producción del biodiesel se deriva de la transesterificación de triglicéridos encontrados en aceites de origen vegetal y animal con un alcohol como el metanol. De esta manera se forman los esteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs), el biodiesel en sí, y como subproducto

¹C. Blum, et al., The concept of sustainable chemistry: Key drivers for the transition towards sustainable development, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **2017**, *5*, 94-104.

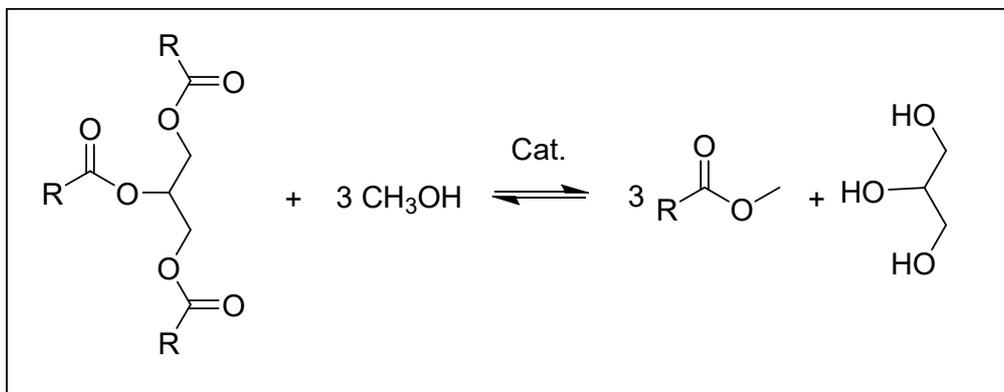
²N. Kelechukwu, et al., Sustainable Transesterification of Cellulose with High Oleic Sunflower Oil in a DBU-CO₂ Switchable Solvent, *ACS Sust. Chem. Eng.*, **2018**, *6*, 8826-8835.

³C. Stevens, R. Verhé, Renewable Bioresources: Scope and Modification for Non-Food Applications, *WILEY*, **2004**.

⁴L. Lin, Z. Cunshan, S. Vittayapagung, S. Xiangqian, D. Mindong, Opportunities and challenges for biodiesel fuel, *Appl. Energy*, **2011**, *88*, 1020-1031.

⁵A. Liaquat, M. Kalam, H. Masjuki, M. Jayed, Potential emissions reduction in road transport sector using biofuel in developing countries, *Atmos. Environ.*, **2010**, *44*, 3869-3877.

el glicerol (Esquema 1).⁶ Este proceso libera aproximadamente el 10% en peso de glicerina o glicerol.⁷



Esquema 1: Reacción de transesterificación de triglicéridos con metanol.

El incremento en la producción mundial del biodiesel ha llevado a generar grandes cantidades de glicerol como subproducto. Se predijo que para 2020 la producción a nivel mundial de éste será de 41.9 mil millones de litros anuales.⁸ El glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel contiene impurezas como el agua, sales inorgánicas, metanol, ácidos grasos y esteres.⁹ Por lo tanto, el mismo se trata como un desecho de esta industria, llegando algunas empresas incluso a pagar por su eliminación.¹⁰ Debido a la enorme cantidad generada de glicerol, el precio actual del glicerol crudo es tan bajo como 0.04–0.09 \$ / lb.¹¹ Adicionalmente, la tendencia es a reducir aún más su valor, dado el rápido crecimiento previsto de la producción de biodiesel.¹²

⁶ J. Marchetti, V. Miguel, A. Errazu, Possible Methods for Biodiesel Production, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, **2007**, *11*, 1300-1311.

⁷ A. Abbott, P. Cullis, R. Harris, E. Raven, Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid, *Green Chem.*, **2007**, *9*, 868- 872.

⁸ P. Silva, V. Gonzalves, C. Mota, Glycerol acetals as anti-freezing additives for biodiesel, *Bioresour Technol*, **2010**, *101*, 6225- 6229.

⁹ X. Liu, Y. Cui, J. Trushenski, J. Blackburn, Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation, *Bioresour Technol*, **2010**, *101*, 7581- 7586.

¹⁰ R. Malaya, et al., Catalytic conversion of glycerol for sustainable production of solketal as a fuel additive: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2016**, *56*, 1022- 1031.

¹¹ D. Nilles, Combating the Glycerin Glut, *Biodiesel Magazine*, **2016**, <http://www.biodieselmagazine.com/articles/1123/combating-the-glycerin-glut>.

¹² M. Haas, A. McAloon, W. Yee, T. Foglia, A process model to estimate biodiesel production costs, *Bioresour Technol*, **2006**, *97*, 671- 678.

En este sentido, ha sido necesario desarrollar una valorización del mismo y con esto incrementar la sostenibilidad de la industria del biodiesel. En otro enfoque, se podría considerar la industria de los biocombustibles como un mercado adecuado para absorber un alto volumen de glicerol para aplicaciones de valor agregado. El glicerol posee gran potencial para convertirse en un aditivo para el combustible, aunque, debido a problemas de solubilidad, polimerización y de su descomposición a elevadas temperaturas, no se puede agregar directamente. Sin embargo, su conversión en cetales y éteres ha demostrado ser útil al disponer estos derivados del potencial necesario para ser utilizados como aditivos de combustible oxigenados.^{13 14}

El glicerol y sus derivados de acetal (AG: acetales de glicerol) se encuentran en la lista actual de los principales productos químicos derivados de la biomasa y se utilizan como bloques de construcción para productos químicos de mayor valor añadido.^{15 16} Los cetales y los éteres se pueden emplear directamente como aditivos de combustible oxigenado o como promotores de la combustión, ya que la adición de cetales y éteres mejora el índice de octano, el flujo en frío y las propiedades de ignición del combustible, además, de optimizar algunas de las propiedades del biodiesel como biocombustible, incluyendo la viscosidad, el número de cetano, el cloud point, la estabilidad de oxidación y la reducción de emisiones.¹⁴

Dichos cetales se sintetizan por la cetalización del glicerol con acetona, acetaldehído o formaldehído, lo que representa un camino viable para producir diferentes acetales como el solketal, el glicerol acetal, el glicerol formal (Esquema 2), el propil dioxolano o el propil dioxano. Sin embargo, el glicerol formal ha sido estudiado recientemente en enfoques combinados de transesterificación-acetalización para alcanzar la síntesis de una nueva clase de aditivos de combustible basados en glicerol crudo y aceites de desecho.¹⁷

¹³ C. Quispe, C. Coronado, J. Carvalho, Glycerol: production, consumption, prices and new trends in combustion, *Renew Sustain Energ. Rev.*, **2013**, *27*, 475- 493.

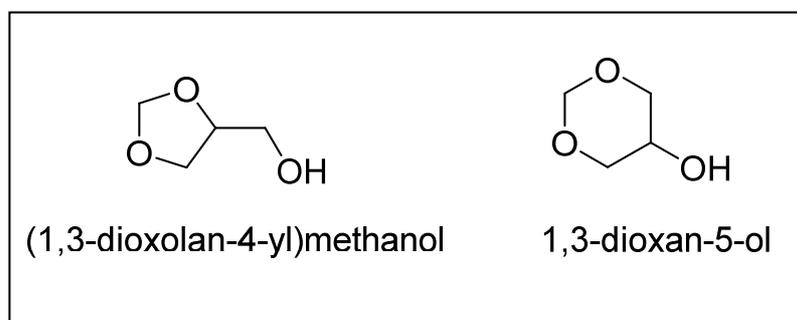
¹⁴ Y. Zhou, et al., Production of fumaric acid from biodiesel derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*, *Bioresour Technol*, **2014**, *163*, 48- 53.

¹⁵ T. Farmer, M. Mascal, In Introduction to Chemical from Biomass, *John Wiley & Sons*, 2015.

¹⁶ C. Len, R. Luque, Continuous Flow transformation of glycerol to valuable products: an overview, *Sustainable Chem*, **2014**, *2*, 1-10.

¹⁷ L. Yang, Z. Zhu, W. Wang, X. Lu, Microbial recycling of glycerol to biodiesel, *Bioresour Technol*, **2013**, *150*.

Específicamente, se ha considerado un proceso mediante el cual, a partir de residuos de triglicéridos, glicerol y dimetoximetano (DMM) como reactivo de acetalización, se obtuvieron los esteres de glicerol-formal de los ácidos grasos, ya sea en forma pura o como una mezcla con los esteres metílicos de la grasa.



Esquema 2: Isómeros del glicerol formal.

La transformación de los derivados de glicerol en esteres de ácidos grasos de cadena larga también es prometedora, incrementando el contenido de oxígeno del biocombustible, lo que es deseable.¹⁸ De esta manera, toman importancia los esteres de ácidos grasos de solketal (FASEs) y los esteres de ácidos grasos de glicerol (FAGEs), habiéndose descrito como muy eficientes las mezclas de biodiesel de FAMEs con FAGEs,¹⁹ y, por lo tanto, los métodos para la síntesis de FAGEs se consideran de gran relevancia.

Hasta ahora, los FAGEs y los FASEs se han obtenido mediante la transesterificación de FAMEs con glicerol formal y solketal respectivamente (Esquema 3a-3b), utilizando carbonato de sodio²⁰ u óxidos derivados de materiales naturales ricos en calcio²¹ como catalizadores, o mediante la

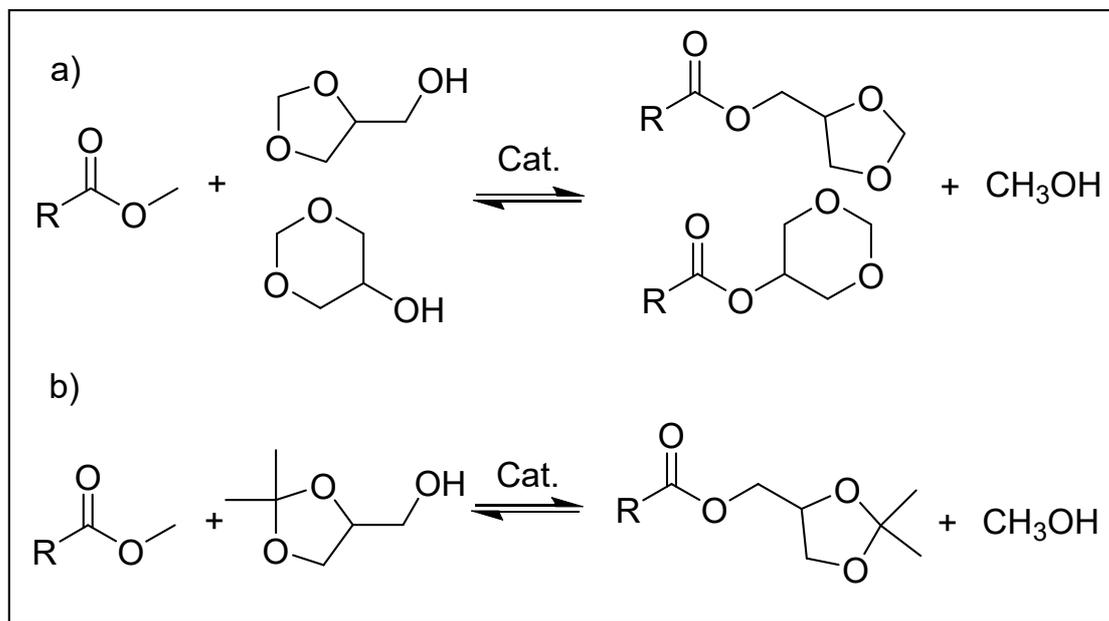
¹⁸ P. Lozano, C. Gomez, A. Nicolas, R. Polo, S. Nieto, J.M. Bernal, E. García-Verdugo, S.V. Luis, Clean Enzymatic Preparation of Oxygenated Biofuels from Vegetable and Waste Cooking Oils by Using Spongelike Ionic Liquids Technology, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, *4*, 6125– 6132.

¹⁹ M. Lapuerta, J. Rodriguez, C. Estevez, N. Bayarri, Properties of fatty acid glycerol formal ester (FAGE) for use as a component in blends for diesel engines, *Biomass Bioenergy*, **2015**, *76*, 130–140.

²⁰ L. Batista, R. San Gil, L. Lopes, V. Soares, Evaluation of a glycerol derived biofuel by thermal analysis, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **2011**, *106*, 697–702.

²¹ S. Sankaranarayanan, W. Jindapon, Chawalit Ngamcharussrivichai, Valorization of biodiesel plant-derived products via preparation of solketal fatty esters over calcium- rich natural material derived oxides, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **2017**, *81*, 57–64.

esterificación de ácidos grasos, empleando enzimas²² y catalizadores o resinas de carácter ácido.^{23 24}



Esquema 3: Transesterificación de esteres metílicos, a) Reacción de transesterificación de esteres graso de metilo con glicerol formal, b) Reacción de transesterificación de esteres grasos de metilo con solketal.

Dentro de este contexto, en el presente trabajo se describe la síntesis y caracterización de los esteres de glicerol formal (FAGEs) en sistemas de flujo continuo, empleando varias técnicas de catálisis y optimizando los parámetros de la reacción de transesterificación de esteres metílicos, con el principal objetivo de orientar la reacción a la producción industrial a gran escala de FAGEs en mezclas de FAMEs, para la reducción y/o eliminación del subproducto principal en la producción clásica del biodiesel, “el glicerol”, y obtener un biocombustible que pueda competir económicamente con el combustible diesel, y así contribuir a incrementar la cuota de mercado de los biocombustibles para los años venideros.

²² P. Lozano, C. Gomez, A. Nicolas, R. Polo, S. Nieto, J.M. Bernal, E. García-Verdugo, S.V. Luis, Clean Enzymatic Preparation of Oxygenated Biofuels from Vegetable and Waste Cooking Oils by Using Spongelike Ionic Liquids Technology, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, *4*, 6125-6132.

²³ C. Yu, Y. Lee, B. Cheon, S. Lee, Synthesis of glycerol monostearate with high purity, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **2003**, *24*, 1229–1231.

²⁴ A. Perosa, A. Moraschini, M. selva, M. Noé, Synthesis of fatty acid esters of solketal and glycerol-formal: biobased specialty chemicals. *Molecules*, **2006**, *21*, 170–178.

3. Objetivos

La síntesis de FAGEs en flujo continuo es un tema de gran relevancia de cara a llevar la reacción a nivel industrial, reemplazando la producción clásica de FAMEs, eliminando los residuos de glicerol (subproducto de la reacción) y obteniendo mejoras en el biocombustible. En el presente trabajo, se discutirá el diseño y optimización de la reacción de transesterificación de esteres metílicos de ácidos grasos en flujo continuo.

3.1. Objetivo General

- Desarrollar y optimizar la reacción de transesterificación de esteres metílicos de ácidos grasos en flujo continuo, para la síntesis de FAGEs.

3.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar los productos de partida y los métodos de análisis y caracterización a utilizar.
- Realizar pruebas iniciales de catalizadores, disolventes y condiciones de reacción en “*batch*”.
- Trasladar la reacción a flujo continuo empleando las condiciones pre- optimizadas en los sistemas en “*batch*”.
- Optimizar la reacción en flujo continuo, realizando variaciones en los parámetros necesarios según el sistema empleado.
- Realizar un estudio de ECOSCALE de la reacción y determinar si sería factible su implementación a nivel industrial.

4. Resultados y Discusión

4.1. Selección de productos de partida

El presente trabajo se enfocó en desarrollar la reacción de transesterificación de ésteres metílicos de ácidos grasos FAMEs con los acetales de los isómeros del glicerol formal (Esquema 3a) en flujo continuo, por lo cual fue necesaria la adecuada selección de los productos de partida y métodos de análisis y caracterización de los compuestos.

4.1.1. Productos de partida

El ester graso de metilo FAME seleccionado para la reacción modelo de transesterificación fue el laurato de metilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}_3$, C12:0), junto con los acetales de los isómeros del glicerol formal GlyF (Esquema 2), lo que permitiría incorporar al glicerol (subproducto de la producción clásica de biodiesel), en forma de sus acetales de GlyF en el biocombustible. Ambos isómeros presentan un grupo hidroxilo libre disponible para esta reacción.

Se ha realizado también una selección preliminar del tipo de catalizador. Ente los posibles catalizadores ácidos se seleccionó el PTSA (ácido de Brønsted) como catalizador convencional, el cual presenta características atractivas para su uso a nivel industrial tales como la disponibilidad comercial, termo estabilidad, reciclabilidad, facilidad de manejo y acidez modulable.²⁵ Como alternativa se seleccionó el Novozym 435 como catalizador enzimático soportado sobre una matriz polimérica. Además, se realizaron pruebas de la reacción sin presencia de catalizador.

Desde los primeros ensayos, debido a la baja miscibilidad de los dos reactivos que intervienen en la síntesis del FAGE y también de cara a disminuir la viscosidad del sistema, se consideró pertinente el uso de 2-metiltetrahidrofurano MTHF como disolvente, por lo cual, también se estudió la solubilidad y estabilidad de la mezcla de FAME y glicerol formal en el mismo.

²⁵ A. Mahendra, B. Jitendra, S. Deepak, R. Nivrutti, S. Murlidhar, A highly efficient and sustainable synthesis of dihydropyrano[2,3-c]pyrazoles using polystyrenesupported p-toluenesulfonic acid as reusable catalyst, *Cogent Chemistry*, **2015**, 1, 1- 9.

4.2. Pruebas iniciales en “batch”

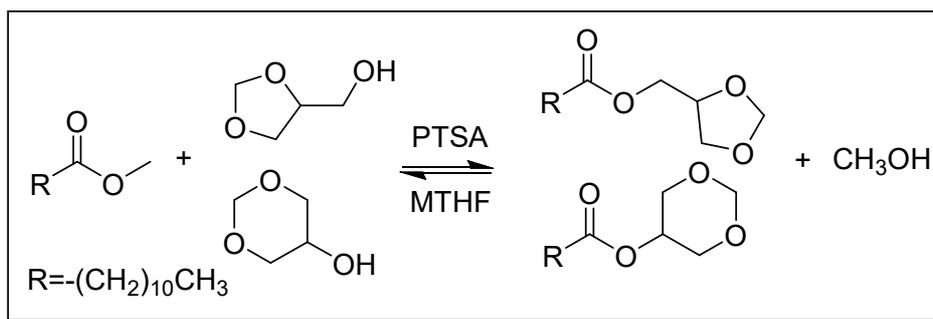
Con el objetivo de pre-optimizar la reacción, paso previo al estudio de sistemas de flujo continuo, se tomó como referencia el laurato de metilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}_3$, C12:0), comúnmente encontrado en las mezclas de FAMEs.²⁶ Éste se hizo reaccionar en diferentes condiciones y relaciones con los isómeros del glicerol formal en MTHF, empleando tres sistemas de síntesis, el primero, con un catalizador ácido (PTSA) en bajas concentraciones, el segundo, con un catalizador enzimático comercial (Novozym 435, CALB inmovilizada en una resina acrílica) y finalmente, un sistema sin catalizador. Los resultados y la optimización mediante activación por microondas (“batch”) de estas rutas sintéticas se presentan a continuación.

4.2.1. Catalizador ácido PTSA

El inconveniente principal que presenta el uso de condiciones ácidas con los acetales del GlyF, es su baja estabilidad.²⁴ En el presente trabajo de investigación, se realizó un diseño experimental secuencial, con el fin de optimizar los parámetros de la reacción. Era necesario demostrar que es posible llevar a cabo la transesterificación mediante catálisis ácida sin producir la apertura de los anillos de acetal, en condiciones operativas leves y en presencia de bajas concentraciones de PTSA.

En este sentido, el FAME seleccionado se hizo reaccionar con glicerol formal en presencia de PTSA, empleando MTHF como disolvente (Esquema 4). A continuación, se presentan los resultados del “Diseño Experimental I” empleado para la optimización de los siguientes parámetros de reacción: la relación molar, el porcentaje de dilución de la mezcla, la carga del catalizador, la temperatura del sistema y el tiempo de reacción. Dichos parámetros fueron fundamentales para poder llevar a la reacción al sistema de flujo continuo seleccionado.

²⁶ M. Schutter, R. Dick, Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **2000**, *64*, 1659- 1668.



Esquema 4: Transesterificación de esteres metílicos en condiciones ácidas.

4.2.1.1. Relación molar

En esta etapa se buscó determinar la relación molar FAME: GlyF ideal para favorecer la reacción. Se empleó una dilución inicial de la mezcla de los productos de partida de un 30 % v/v en MTHF, una carga inicial de catalizador de un 10 % w/w con respecto al FAME y una temperatura de 100 °C. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Diseño experimental I – Relación molar.

Código de reacción	Relación Molar FAME: GlyF	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_rm_1	1:1	2	47
ct_tfm_rm_2	2:1	2	41
ct_tfm_rm_3	3:1	2	9
ct_tfm_rm_4	1:2	2	55
ct_tfm_rm_5	1:3	2	63

Dilución 30% v/v en MTHF, Carga de PTSA 10% w/w FAME, Temperatura 100 °C MW. Rendimiento determinado por GC.

Se observó por análisis de GC que las reacciones fueron selectivas hacia la formación del FAGE, sin detectar rastros de los productos de la apertura de los acetales. Los mejores rendimientos se obtuvieron al utilizar el glicerol formal en exceso. Por lo tanto, la siguiente etapa del presente diseño experimental tomó la relación molar 1:3 FAME: GlyF como base para la optimización.

4.2.1.2. Dilución del sistema

Con el objetivo de obtener una mezcla fluida y efectiva para los sistemas en flujo continuo que posteriormente debían implementarse, se realizó un estudio del porcentaje de dilución v/v mezcla: MTHF. Para esto, se mantuvo la relación molar seleccionada en el apartado anterior (1:3 FAME: GlyF), al igual que la

carga de catalizador y la temperatura. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Diseño experimental I – Dilución del sistema.

Código de reacción	Dilución (%v/v)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_cd_1	30	2	63
ct_tfm_cd_2	20	2	56
ct_tfm_cd_3	40	2	65
ct_tfm_cd_4	50	2	69
ct_tfm_cd_5	60	2	60

Dilución en %v/v mezcla/MTHF, Carga de PTSA 10% w/w FAME, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 100 °C MW. Rendimiento determinado por GC.

Se consiguieron los mejores rendimientos al diluir la mezcla en un 50% de MTHF. Consecuentemente, la siguiente etapa tomó la dilución seleccionada como la mejor proporción para la optimización.

4.2.1.3. Carga del catalizador

La siguiente etapa del diseño experimental fue la optimización de la carga del catalizador ácido, PTSA, para lo cual se buscó una disminución del mismo en el sistema, con el fin de emplear la mínima carga de catalizador posible. Adicionalmente, se mantuvieron los parámetros optimizados previamente. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Diseño experimental I – Carga del catalizador.

Código de reacción	Carga de PTSA (%m/m)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_cc_1	10	2	69
ct_tfm_cc_2	6	2	78
ct_tfm_cc_3	4.5	2	72
ct_tfm_cc_4	3	2	70
ct_tfm_cc_5	1	2	43

Dilución 50 % v/v mezcla/MTHF, Carga PTSA en %w/w FAME, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 100 °C MW. Rendimiento determinado por GC.

Se pudo observar que es posible la reducción de la carga del catalizador de un 10 a un 6% w/w del FAME, sin afectar significativamente el porcentaje de conversión del laurato de metilo en laurato de glicerol formal, disminuyendo así, la concentración ácida de la reacción y, por lo tanto, asegurando la estabilidad de los acetales del GlyF.

4.2.1.4. Temperatura

En busca de la temperatura óptima que promueva la reacción, se realizó un estudio del efecto de la misma en la reacción, manteniendo el resto de parámetros previamente seleccionados. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Diseño experimental I – Temperatura.

Código de reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_T_1	100	2	78
ct_tfm_T_2	60	2	33
ct_tfm_T_3	120	2	72
ct_tfm_T_4	130	2	71
ct_tfm_T_5	160	2	67

Dilución 50 % v/v mezcla/MTHF, Carga PTSA 6 % w/w FAME, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura en °C MW. Rendimiento determinado por GC.

Los resultados mostraron, que la reacción se favorece al emplear una temperatura media en el sistema, obteniendo mejores rendimientos del FAME a 100 °C. Por lo cual, esta temperatura se empleó en la etapa final del diseño experimental.

4.2.1.5. Tiempo de reacción

Para concluir con el “Diseño Experimental I” del sistema catalítico ácido, se realizó un estudio utilizando diferentes tiempos de reacción. Estos tiempos se relacionaron con los tiempos de residencia para los sistemas de flujo continuo, y, por lo tanto, en el flujo necesario para el sistema. Para estas reacciones, se consideraron igualmente todos los parámetros previamente optimizados. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5: Diseño experimental I – Tiempo.

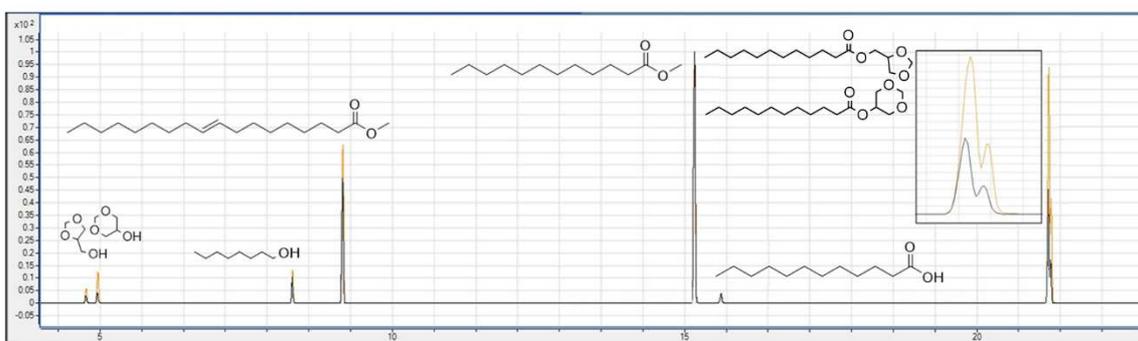
Código de reacción	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
ct_tfm_tr_1	120	77
ct_tfm_tr_2	30	63
ct_tfm_tr_3	60	68
ct_tfm_tr_4	180	79
ct_tfm_tr_5	210	78

Dilución 50 % v/v mezcla/MTHF, Carga PTSA 6 % w/w FAME, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 100 °C MW. Rendimiento determinado por GC.

Se determinó, que a partir de las 2 horas el rendimiento no tiene un incremento significativo, por lo cual se seleccionó el tiempo de 120 min para la reacción en el sistema de flujo.

4.2.1.6. Análisis del diseño experimental

Mediante la optimización realizada para la reacción de transesterificación de laurato de metilo con glicerol formal, para la síntesis del FAGE correspondiente, se pudieron encontrar los parámetros que favorecen la misma. Llevando la reacción desde un 47 % hasta un 77 % de rendimiento (Esquema 5).



Esquema 5: Comparación de los cromatogramas correspondientes a la reacción antes (negro) y después (naranja) de implementar el “Diseño experimental I” (ANEXO A).

Los parámetros seleccionados para llevar la reacción al sistema de flujo continuo, se presentan a continuación en la Tabla 6.

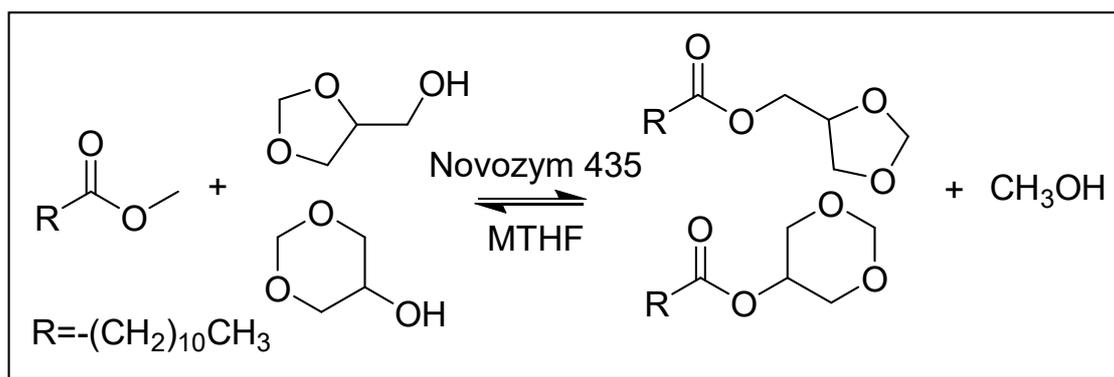
Tabla 6: Parámetros seleccionados con PTSA como catalizador.

Parámetro	Cantidad	Unidades
Relación molar	1:3	mol FAME: mol GlyF
Dilución	50	%Vmezcla/VMTHF
Carga de Catalizador	6	%mPTSA/mFAME
Temperatura	100	°C
Tiempo	120	min

4.2.2. Catalizador Novozym 435

La siguiente ruta sintética, pretendió estudiar el uso de un catalizador enzimático comercial “Novozym 435”, el cual se basa en la inmovilización de una lipasa termoestable (CALB), en una resina acrílica macroporosa. Dicha enzima se produce por la fermentación sumergida de un microorganismo genéticamente modificado de *Aspergillus niger* y se adsorbe en la resina.²⁷ Este catalizador se reporta como una alternativa ecológica y particularmente útil en la síntesis de esteres y amidas.^{28,29}

Por lo tanto, el FAME seleccionado se hizo reaccionar con glicerol formal en presencia de “Novozym 435” empleando MTHF como disolvente (Esquema 6). En esta etapa se seleccionaron como parámetros a optimizar: la relación molar, la cantidad de disolvente y el tiempo de reacción. Los resultados del “Diseño Experimental II” realizado para la optimización de la reacción bajo la presente ruta sintética se muestran a continuación.



Esquema 6: Transesterificación de esteres metílicos en catálisis enzimática.

²⁷ O. Lars, R. Nieguth, M. Eckstein, M. Naumann, O. Thum, M. Ansorge, Composite Particles of Novozym 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers, *ChemCatChem*, **2009**, *1*, 455-462.

²⁸ Y. Dahai, L. Tian, M. Dongxiao, W. Hao, W. Zhi, L. Wang, X. Fang, Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435, *Green Chem.*, **2010**, *12*, 844-850.

²⁹ J. Molina, F. Santos, M. Gonzáles, E. Ramírez, E. Sánchez, Síntesis Enzimática de Alcamidas en Sistemas No Acuósos y Ensayo de su Bioactividad *In Vitro*, *Lat. Am. J. Pharm.*, **2008**, *27*, 852-858.

4.2.2.1. Relación molar

En esta etapa, se empleó una dilución inicial de la mezcla de los productos en MTHF del 17 % v/v, una relación másica 1:1 FAME-Catalizador y una temperatura de 45 °C. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: Diseño experimental II – Relación molar.

Código de reacción	Relación Molar FAME: GlyF	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_rm_1_E	1:1	24	28
ct_tfm_rm_2_E	2:1	24	18
ct_tfm_rm_3_E	3:1	24	13
ct_tfm_rm_4_E	1:2	24	21
ct_tfm_rm_5_E	1:3	24	64

Dilución 17 % v/v mezcla/MTHF, Relación Novozym 435 1:1 w/w FAME, Temperatura 45 °C. Rendimiento determinado por GC.

La reacción se dejó evolucionar durante 24 horas, con el objetivo de llevar al sistema a la máxima conversión posible. Al igual que en la anterior ruta sintética, se observó por análisis de GC que las reacciones fueron selectivas hacia la formación del FAGE. Del mismo modo, se obtuvieron también, los mejores de rendimiento al utilizar el glicerol formal en exceso. Consecuentemente, la siguiente etapa del presente diseño experimental utilizó la relación molar 1:3 FAME: GlyF.

4.2.2.2. Dilución del sistema

Para determinar la cantidad necesaria de disolvente que mejore la interacción del sistema, se realizaron una serie de reacciones con distintos porcentajes de dilución v/v mezcla: MTHF. Se mantuvo la relación molar 1:3 para FAME: GlyF, tanto como la relación másica FAME: catalizador y la temperatura. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño experimental II – Dilución del sistema.

Código de reacción	Dilución (%v/v)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_cd_1_E	17	24	64
ct_tfm_cd_2_E	10	24	56
ct_tfm_cd_3_E	30	24	78
ct_tfm_cd_4_E	40	24	65
ct_tfm_cd_5_E	50	24	63

Dilución en %v/v mezcla/MTHF, Relación Novozym 435 1:1 w/w FAME, Temperatura 45 °C, Relación molar 1:3 FAME: GlyF. Rendimiento determinado por GC.

Se observó que el porcentaje de dilución que permite mejores interacciones entre los productos de partida es del 30 % v/v para la mezcla: MTHF. Esto permite el uso óptimo del disolvente a la menor proporción posible sin afectar la eficiencia del sistema.

4.2.1.3. Tiempo de reacción

Finalmente, se realizó un estudio de la reacción para diferentes tiempos considerando los parámetros previamente optimizados. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9: Diseño experimental II – Tiempo.

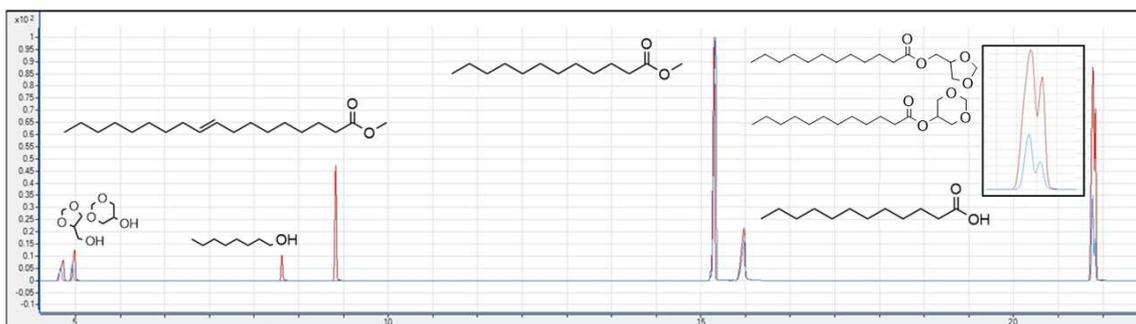
Código de reacción	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_tr_1_E	24	78
ct_tfm_tr_2_E	2	60
ct_tfm_tr_3_E	4	60
ct_tfm_tr_4_E	6	65
ct_tfm_tr_5_E	14	66

Dilución 30 %v/v mezcla/MTHF, Relación Novozym 435 1:1 w/w FAME, Temperatura 45 °C, Relación molar 1:3 FAME: GlyF. Rendimiento determinado por GC.

Se determinó, por tanto, que la reacción puede realizarse en un tiempo de 6 horas, sin que se presente una pérdida significativa en cuanto al rendimiento, permitiendo llevar a cabo la reacción a condiciones suaves y, por lo tanto, disminuyendo el gasto energético en la ruta sintética.

4.2.2.4. Análisis del diseño experimental

El diseño experimental realizado para la segunda ruta sintética, permitió seleccionar los mejores parámetros para llevar a cabo la reacción, permitiendo disminuir el gasto de disolvente y reduciendo el tiempo de reacción a 6 horas con tan solo un pequeño sacrificio en el rendimiento obtenido. Esto permitió mejorar la reacción desde un 28 % hasta un 65 % de rendimiento (Esquema 7).



Esquema 7: Comparación de los cromatogramas correspondientes a la reacción antes (azul) y después (rojo) de implementar el “Diseño experimental II” (ANEXO A).

Los parámetros seleccionados para llevar la reacción al sistema de flujo continuo empleando como catalizador “Novozym 435”, se presentan a continuación en la Tabla 10.

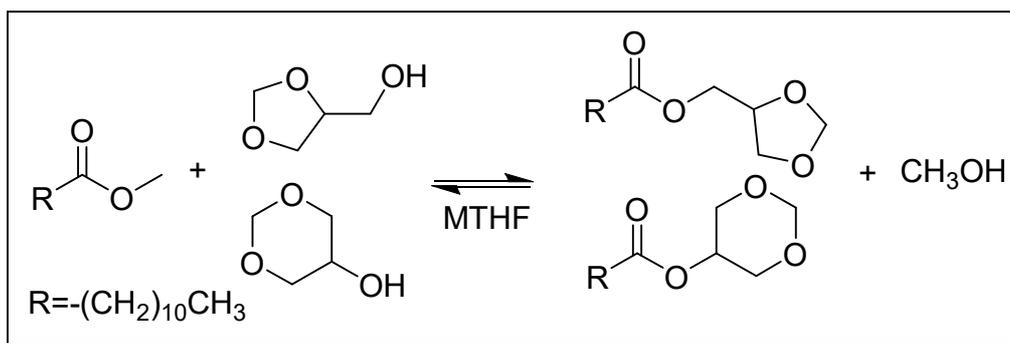
Tabla 10: Parámetros seleccionados con “Novozym 435” como catalizador.

Parámetro	Cantidad	Unidades
Relación molar	1:3	mol FAME: mol GlyF
Dilución	30	%Vmezcla/VMTHF
Temperatura	45	°C
Tiempo	360	min

4.2.3. Sistema sin catalizador

Se investigó también la posibilidad de llevar a cabo la reacción sin presencia de catalizador. Ello permitiría reducir el uso de sustancias auxiliares (quinto principio de la química verde). Se realizó para esto un tercer diseño experimental, para analizar si es posible llevar a cabo la reacción bajo estas premisas con rendimientos suficientes para su implementación.³⁷

De este modo, el FAME seleccionado se hizo reaccionar con glicerol formal con MTHF como disolvente (Esquema 8). A continuación, se presentan los resultados del “Diseño experimental III” empleado para la optimización de los siguientes parámetros de reacción: la relación molar, temperatura, porcentaje de dilución y tiempo de reacción.



Esquema 8: Transesterificación de esteres metílicos si presencia de catalizador.

4.2.3.1. Dilución del sistema

Debido a que los experimentos iniciales mostraron que las variaciones de la relación molar y la temperatura en el sistema no proporcionaban indicios de una mejora en la transesterificación del FAME, se empleó la relación molar optimizada del primer diseño experimental. Es decir, una relación 1:3 FAME: GlyF y una temperatura de 160 °C. Se realizó entonces, un estudio del porcentaje de dilución v/v mezcla: MTHF. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11: Diseño experimental III – Dilución del sistema.

Código de reacción	Dilución (%v/v)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
ct_tfm_cd_1_S	30	2	0
ct_tfm_cd_2_S	20	2	0
ct_tfm_cd_3_S	40	2	0
ct_tfm_cd_4_S	50	2	8
ct_tfm_cd_5_S	60	2	8

Dilución en % v/v mezcla/MTHF, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 100 °C MW. Rendimiento determinado por GC.

De acuerdo con estos resultados, se observó que en las diluciones del 50 y 60 % se detectaban las primeras señales de la formación del laurato de glicerol formal. Al igual que en el primer diseño experimental, se lograron los mejores rendimientos al concentrar en mayor grado la mezcla de los productos de partida. Por lo cual, se seleccionó la dilución del 50 %, para continuar con el diseño experimental.

4.2.3.2. Tiempo de reacción

Se estudió la reacción a diferentes tiempos, para determinar el flujo de partida a implementar, empleando los parámetros seleccionados en el apartado anterior. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12: Diseño experimental III – Tiempo.

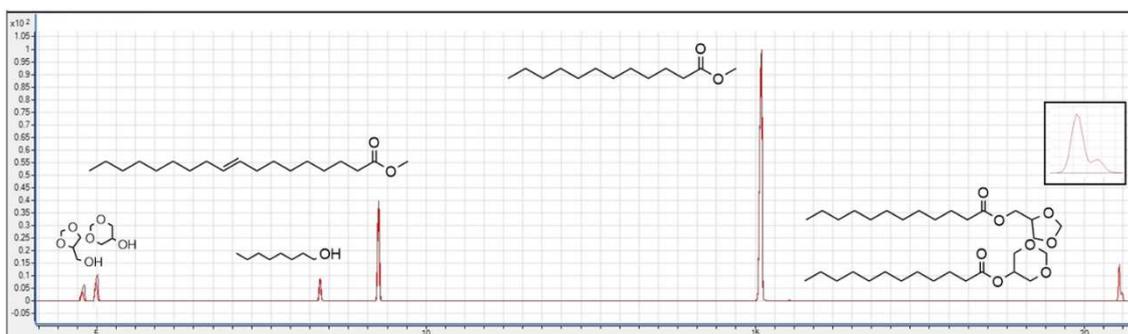
Código de reacción	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
ct_tfm_tr_1_S	120	8
ct_tfm_tr_2_S	60	2
ct_tfm_tr_3_S	30	2
ct_tfm_tr_4_S	180	8
ct_tfm_tr_5_S	210	14

Dilución 60 % v/v mezcla/MTHF, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 100 °C MW. Rendimiento determinado por GC.

Como se pudo observar, los mejores resultados se situaron a las 3.5 horas, los cuales, se utilizaron para trasladar la reacción al sistema de flujo continuo seleccionado.

4.2.3.3. Análisis del Diseño Experimental III

La presente ruta sintética demostró, la posibilidad de realizar la reacción de transesterificación de esteres metílicos de ácidos grasos, sin presencia de catalizador. A pesar, de las bajas concentraciones y rendimientos encontrados, posteriormente se estudió el efecto de la presión en el sistema. Mediante la optimización implementada se llevó la reacción desde un 0 % hasta un 14 % de rendimiento (Esquema 9).



Esquema 9: Comparación de los cromatogramas correspondientes a la reacción antes (negro) y después (rojo) de implementar el “Diseño experimental III” (ANEXO A).

Los parámetros seleccionados para llevar la reacción al sistema de flujo continuo, se presentan a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13: Parámetros seleccionados para la reacción sin catalizador.

Parámetro	Cantidad	Unidades
Relación molar	1:3	mol FAME: mol GlyF
Dilución	50	%Vmezcla/VMTHF
Temperatura	160	°C
Tiempo	210	min

4.3. Flujo continuo

En comparación a los reactores convencionales por lotes (“batch”) utilizados ampliamente a nivel industrial, un reactor de flujo continuo brinda claras ventajas, en cuanto a las perspectivas económicas y ambientales.³⁰ Ofrece mejoras importantes en cuanto a la alta eficiencia de transferencia de calor y masa en el proceso, la mezcla eficiente y necesaria de los fluidos inmiscibles, el control preciso de la estequiometría local y la facilidad del escalado a nivel industrial.^{31 32}

En función de tales ventajas, los sistemas en flujo continuo permiten la automatización de la síntesis química tradicional, con un alto rendimiento y calidad constante del producto final.³³ Por esto y por todas las ventajas presentadas, se trasladaron las diferentes rutas sintéticas optimizadas a estos sistemas.

³⁰ B. Chevalier, E. Lavric, C. Cerato, C. Horn, M. Gbison, R. Harris, E. Raven, Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid, *Green Chem.*, **2007**, *9*, 868- 872.

³¹ T. Noel, S. Buchwald, Cross-coupling in flow, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5010– 5029.

³² R. Hartman, J. McMullen, K. Jensen, Deciding whether to go with the flow: evaluating the merits of flow reactors for synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 7502– 7519.

³³ R. Malaya, Y. Zhongshun, Q. Wensheng, S. Hassan, M. Poirier, X. Chunbao, A new continuous-flow process for catalytic conversion of glycerol to oxygenated fuel additive: Catalyst screening, *Applied Energy*, **2014**, *123*, 75- 81.

4.3.1. Sistema de flujo continuo I

El primer sistema de flujo continuo, consistió en la reacción de transesterificación del laurato de metilo empleando PTSA como catalizador en bajas concentraciones. Para esto se tomó como referencia el “Diseño experimental I”, aplicando los parámetros previamente optimizados en el mismo.

4.3.1.1. Ajuste de temperatura

Es conocido, que la activación por microondas realizada en las pruebas iniciales en “batch”, se basa en la interacción del campo eléctrico con las moléculas que tienen una distribución de carga no nula, bien desplazándolas de lugar o bien haciéndolas girar alrededor de su posición de equilibrio.³⁴ Mientras que, en el sistema de calentamiento empleado para el sistema en flujo, el calentamiento se basa en el intercambio de calor de un horno a un serpentín de acero inoxidable.

Por lo tanto, surgió la necesidad de realizar un estudio del efecto de la temperatura en reacción de síntesis del FAGE, en el nuevo sistema de calentamiento. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 14.

Tabla 14: Estudio de la temperatura en el sistema de flujo continuo.

Código de reacción	Temperatura (°C)	Flujo (ml/min)	Rendimiento (%)
ct_tfm_rf_T_1	100	0.5	24
ct_tfm_rf_T_2	110	0.5	35
ct_tfm_rf_T_3	120	0.5	46
ct_tfm_rf_T_4	130	0.5	52
ct_tfm_rf_T_5	150	0.5	53

Dilución 50 % v/v mezcla/MTHF, Carga PTSA 6 % w/w FAME, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura en °C. Presión 10 bares. Rendimiento determinado por GC.

De acuerdo con estos resultados, se observó que a 130 °C se llegó al equilibrio de la reacción y se obtuvo un producto con mejor pureza óptica que a mayor temperatura. Por lo tanto, se empleó este parámetro para llevar a la reacción a la siguiente etapa.

³⁴ A. Díaz, J. Monzó, E. Domínguez, E. Requena, Principios Fundamentales y Aplicaciones del Calentamiento por Microondas, *UPCT*, 2004.

4.3.1.2. Ajuste de tiempo de residencia

Finalmente, se realizó un estudio del tiempo de residencia en el sistema de flujo continuo, realizando variaciones en el flujo desde 0.1 a 0.5 ml/min. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 15.

Tabla 15: Estudio del flujo (tiempo de residencia) en el sistema de flujo continuo.

Código de reacción	Temperatura (°C)	Flujo (ml/min)	Rendimiento (%)
ct_tfm_rf_f_1	130	0.5	52
ct_tfm_rf_f_2	130	0.4	56
ct_tfm_rf_f_3	130	0.3	62
ct_tfm_rf_f_4	130	0.2	69
ct_tfm_rf_f_5	130	0.1	68

Dilución 50 % v/v mezcla/MTHF, Carga PTSA 6 % w/w FAME, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 130 °C. Presión 10 bares. Rendimiento determinado por GC.

Se seleccionó 0.2 ml/min como el flujo adecuado para promover la reacción, el mismo que equivale a un tiempo de residencia de 2 horas con 47 minutos. Los tiempos de residencia fueron medidos mediante un dispositivo LDR desarrollado en el presente trabajo, el procedimiento de medición experimental se presenta más adelante. Se obtuvo así, un rendimiento máximo de 69 % en la reacción realizada en el sistema de flujo continuo, empleando una presión de 10 bares.

4.3.2. Sistema de flujo continuo II

El segundo sistema de flujo continuo, consiste en la reacción de síntesis del laurato de glicerol formal empleando el catalizador comercial Novozym 435, como catalizador enzimático con soporte polimérico. Para ello, se tomó como referencia el “Diseño experimental II”, aplicando los parámetros previamente optimizados en el mismo.

Por esto, se estudió el tiempo de residencia y al notar bajas concentraciones no equiparables con las pruebas iniciales en “*batch*”, se investigó el efecto de la carga del catalizador en la columna. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 16.

Tabla 16: Estudio del tiempo de residencia y la carga del catalizador en el sistema de flujo continuo.

Código de reacción	Carga del catalizador (g)	Flujo (ml/min)	Rendimiento (%)
ct_tfm_rf_f_1_E	3.60	0.5	22
ct_tfm_rf_f_2_E	3.60	0.3	23
ct_tfm_rf_f_3_E	3.60	0.2	38
ct_tfm_rf_f_4_E	1.80	0.3	48
ct_tfm_rf_f_5_E	1.80	0.2	55

Dilución 30 % v/v mezcla/MTHF, relación molar 1:3 FAME: GlyF, Temperatura 45 °C. Rendimiento determinado por GC.

Es notorio que los rendimientos de la reacción con la mayor carga de catalizador empleada son deficientes. Este efecto, puede producirse por la adsorción del glicerol formal en el soporte polimérico de la enzima, lo que empeora el equilibrio de la reacción. Este tipo de inconvenientes han sido reportados con anterioridad con el glicerol crudo en la reacción de transesterificación de triglicéridos. Por lo que han visto necesario la implementación de un cosolvente polar.³⁵

Por esto, se seleccionó una carga de 1.80 g de catalizador como empaque para la columna y 0.2 ml/min como el flujo adecuado para obtener mejores rendimientos, el mismo que equivale a un tiempo de residencia de 42 minutos (Los tiempos de residencia fueron medidos mediante un dispositivo LDR). Se obtuvo así, un rendimiento máximo de 55 % en la reacción realizada en el sistema de flujo continuo.

4.3.3. Sistema de flujo continuo III

El tercer sistema de flujo continuo, consiste en la reacción de síntesis del laurato de glicerol formal sin la presencia de catalizador. Para esto se tomó como referencia el “Diseño experimental III”, aplicando los parámetros previamente optimizados en el mismo.

³⁵ V. Dossata, D. Combesb, A. Martyb, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production, *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**, 25, 194– 200.

Es así, que se realizaron pruebas de presión (7- 110 bar) y temperatura (100- 230 °C) en el sistema de flujo continuo, el cual, presentó resultados deficientes, de un 5 % de rendimiento máximo con un flujo de 0.1, 10 bares de presión y 230 °C.

4.3.4. Análisis de resultados en flujo continuo

Para el correcto análisis de los resultados obtenidos en los sistemas de flujo continuo, es necesario destacar que el proceso de síntesis de FAGEs requiere solamente la conversión del 40% en peso, que corresponde al consumo de la glicerina procedente del triglicérido.³⁷

Por lo tanto, las conversiones que se obtuvieron en los “Sistemas de flujo continuo I y II” se consideran muy buenas y suficientes para incorporar el glicerol (subproducto de la producción clásica de biodiesel) en forma de sus acetales en el biocombustible. Eliminando la necesidad de gestionar un subproducto con poco valor agregado y mejorando la economía atómica de la reacción.

Por otro lado, el “Sistema de flujo continuo III” sin presencia de catalizador, no presentó resultados ni satisfactorios ni suficientes para considerarlos en su implementación a nivel industrial.

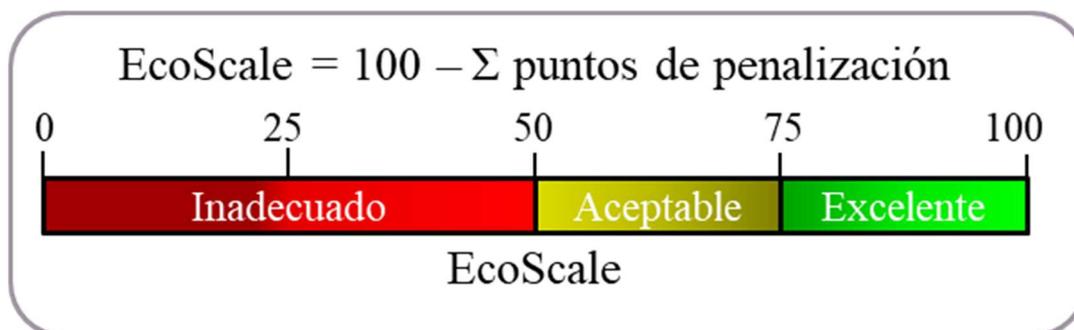
4.4. EcoScale

El EcoScale es una herramienta de gestión para la evaluación de implementación un proceso de química orgánica. Los parámetros del proceso son, entre otros, el costo de la materia prima, el rendimiento, el tiempo de producción, el volumen de producción, el número de pasos en la secuencia sintética, los requisitos de equipos especiales o la reproducibilidad.³⁶

Con este propósito, la herramienta usa una escala de 0 a 100, donde 0 representa una reacción totalmente fallida y 100 representa la reacción ideal que se define de la siguiente manera: El compuesto A (sustrato) sufre una reacción con (o en presencia de) compuesto(s) de bajo costo B para proporcionar el

³⁶ K. Aken, L. Streckowski, L. Patiny, EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 2, 1- 7.

compuesto C deseado con un rendimiento del 100% a temperatura ambiente con un riesgo mínimo para el operador y un impacto mínimo para el medio ambiente (Esquema 10).



Esquema 10: Escala de interpretación de resultados EcoScale.

Para esto, se analizan 6 parámetros generales que influyen en la calidad de las condiciones de reacción. Los mismo, que se asignan puntos de penalización individuales que tienen en cuenta todas las situaciones posibles al configurar un experimento de química orgánica. Los puntos de penalización se acumulan y se cualifican mediante la escala EcoScale.

En el presente trabajo, se implementó la herramienta EcoScale para determinar si es adecuada la implementación de los “Sistemas de flujo continuo I y II”, ya que estos presentaron los mejores rendimientos y satisfacen el objetivo de la reacción de transesterificación de esteres grasos de metilo. Se obtuvieron como resultados 75.35 y 66.50 respectivamente.

Por lo tanto, según la escala de puntos EcoScale la reacción que emplea PTSA como catalizador se encuentra en el rango de “Excelente” y la reacción que emplea “Novozym 435” se considera como “Aceptable”. Las diferencias encontradas entre los dos sistemas se asocian, principalmente, a los elevados costos del catalizador enzimático soportado. Las tablas de penalización de puntos empleada para el análisis se presentan en el ANEXO B en el material suplementario del presente trabajo.

5. Sección Experimental

En esta sección, se describen las técnicas de análisis y caracterización empleadas para los compuestos implicados en la reacción. Junto a ello se incluyen los procedimientos sintéticos y los datos experimentales de las diferentes reacciones realizadas.

5.1. Técnicas de análisis e instrumentación ³⁷

5.1.1. Cromatografía de Gases-FID

Los análisis de cromatografía de gases se utilizaron para cuantificar los FAMEs, FAGEs y el glicerol formal. Dichos análisis se efectuaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820, equipado con un detector de ionización de llama y una columna Agilent HP-5 de 30mx 320µmx 0,25µm.

5.1.1.1. Preparación de la disolución patrón

El patrón empleado para los esteres metílicos fue el octanoato de metilo y para el glicerol formal GlyF fue el 1-octanol. Se preparó una disolución patrón conteniendo 250 mg de octanoato de metilo y 100 µl de 1-octanol en 100 ml de heptano HPLC. Puesto que tanto el glicerol formal como los FAGEs sintetizados presentan cierto factor de pérdida en el área de los picos cromatográficos (debido a su baja solubilidad en heptano), la cuantificación se basó principalmente en la conversión de los FAMEs.

5.1.1.2. Preparación de muestras

Para la preparación de las muestras, fue necesario diluir 10 mg teóricos de FAME en 1 ml de disolución patrón. Para el cálculo del volumen a tomar de la muestra se siguió la siguiente fórmula.

$$Vm = \frac{0.0115 * Vsc}{Vf}$$

³⁷ N. Bayarri, Desarrollo de un biocombustible avanzado de máxima economía de átomos a partir de aceites usados y grasas animales, tesis doctoral, *Universitat Jaume I*, 2015.

En donde:

V_m . = Volumen a tomar de muestra con 10 mg teóricos de FAME.

V_{sc} . = Volumen de solución inicial.

V_f . = Volumen de FAME inicial.

5.1.1.3. Cálculo de la conversión

El cálculo de la conversión de los FAMEs se llevó a cabo obteniendo una constante de relación (k_i) la cual relaciona el comportamiento en área del pico del patrón primario (octanoato de metilo) con el pico del FAME correspondiente. Ésta se calculó preparando una solución inicial de 10 mg de laurato de metilo en 1 ml de la disolución patrón. La constante de integración calculada fue de 0.8432, implementando posteriormente las siguientes fórmulas.

$$[C_m] = \frac{k_i * [C_{pp}] * [A_m]}{[A_{pp}]} \quad \%C = \frac{[C_m]}{0.01} * 100\%$$

En donde:

$[C_m]$ = La concentración de FAME en la muestra.

$[C_{pp}]$ = La concentración del octanoato de metilo 0.0025 g/ml.

$[A_{pp}]$ = El área del patrón primario en el cromatograma.

$[A_{mm}]$ = El área del FAME en el cromatograma.

$\%C$ = Conversión porcentual del FAME.

5.1.1.4. Método

Los parámetros considerados para el método cromatográfico, se presentan a continuación en la Tabla 17.

Tabla 17: Método cromatografía de gases – FID.

Modo de Inyección		Split	
T. Inyector		300°C	
Gas portador		N2/Aire	
Split ratio		50	
Tiempo total del programa		30 min	
Programa de Temperatura			
1	-	40°C	1 min
2	10°C/min	130°C	3 min
3	40°C/min	200°C	5 min
4	15°C/min	320°C	5 min

5.1.1.5. Identificación de compuestos

A continuación, se detalla el tiempo de retención de los compuestos en cuestión Tabla 18.

Tabla 18: Tiempos de retención del Glicerol Formal, 1-octanol, FAMEs y FAGE.

Producto	Tiempo de retención (min)
Glicerol formal	4.7 y 4.9
1-Octanol (Patrón GlyF)	8
Octanoato de metilo (Patrón FAME)	8.9
Laurato de metilo (FAME)	15.3
Laurato de glicerol formal (FAGE)	21.6

5.1.2. Cromatografía de capa fina

5.1.2.1. Preparación de muestras

Se pesó inicialmente 1 g de muestra en un vial de 8 ml, añadiendo la cantidad necesaria de disolvente (MTHF) para llevar a la solución a una concentración %v/v de 12,5% y verificando la disolución total de la muestra. Se extrajeron 0,3 ml de esta disolución, colocándola en un vial de 2 ml que se diluyeron con 1 ml del mismo disolvente.

5.1.2.2. Condiciones de Cromatografía en capa fina

Los parámetros considerados para realizar la cromatografía de capa fina para compuestos polares y apolares se describe a continuación Tabla 19.

Tabla 19: Condiciones cromatografía de capa fina.

Parámetro	Compuestos Apolares	Compuestos Polares
Fase móvil	Hexano: acetato de etilo (90:10)	Hexano: acetato de etilo (25:75)
Fase estacionaria	SiO ₂	SiO ₂
Revelador químico	KMnO ₄	KMnO ₄

5.1.2.3. Preparación de patrones

En paralelo a la preparación de la muestra, un 1 g de patrón (FAME y GlyF) se disolvió en 7 ml de disolvente, y una alícuota de 0,3 ml de esta disolución se diluyó con 1 ml del mismo disolvente.

5.1.2.4. Procedimiento experimental

Se colocó un punto de siembra de la disolución de muestra y de la disolución de patrones en la fase estacionaria. Posteriormente, se introdujo la placa en un recipiente y se eluyó con la mezcla de disolventes hasta 1 cm del final de la placa. Se agitó ligeramente la placa para secarla y se la reveló con permanganato potásico.

5.1.3. Instrumento LDR

El dispositivo LDR (light-dependent resistor), se basó en la emisión y recepción de luz a través de un medio (Líquido-Gas). Empleando como receptor una célula fotoeléctrica, la cual por la incidencia de la luz puede variar su resistividad eléctrica desde los 50 ohms (cuando la incidencia de la luz es alta), hasta varios megaohmios (cuando la incidencia de la luz es nula).³⁸ Esta señal, es detectada por la entrada analógica de una placa Arduino UNO y a la vez, la placa es conectada a un software libre que permite realizar la interpretación

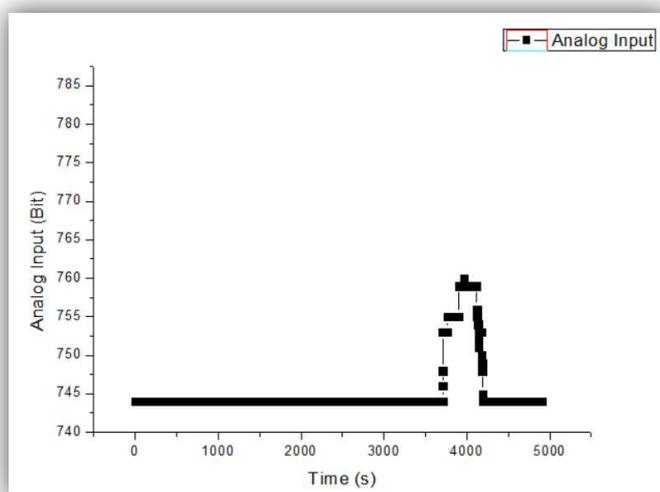
³⁸ Z. Feng, et al., Spin Hall angle quantification from spin pumping and microwave photoresistance, *Phys. Rev. B.*, **2012**, *85*, 214- 423.

grafica de los datos obtenidos. El circuito y la programación del dispositivo se presentan en el ANEXO C en el material suplementario del presente trabajo.

El desarrollo del dispositivo LDR tuvo dos objetivos esenciales. El primero, medir tiempos de residencia en sistemas de flujo continuo. Permitiendo ayudar a diseñar adecuadamente nuevos procesos basados en el uso de sistemas de flujo continuo, lo que hoy en día es un objetivo esencial en la actualidad, en busca del desarrollo de nuevas tecnologías eficientes y limpias.³⁹ El segundo, fue determinar el tiempo en el que el sistema llega al punto de equilibrio, lo que facilita la toma de muestras en estos sistemas.

5.1.3.1. Procedimiento experimental

Con una válvula de inyección Rheodyne de 500 μ l, se inyectó al sistema de flujo continuo (estabilizado con los productos de partida), un “*tracer*” compuesto de MTHF (10 ml, 99.18 mmol) y Rosa de Bengala (10 mg, 0.010 mmol), obteniendo una señal que permitió determinar el tiempo de residencia del mismo en el sistema. A continuación, se presenta una gráfica realizada con los datos obtenidos del dispositivo LDR (Esquema 11).



Esquema 11: Espectro de tiempo de residencia del sistema de calentamiento por serpentín. Volumen del reactor 33 ml. Tiempo de residencia de 1 hora y 7 minutos.

³⁹ V. Sans, N. Karbass, M. Burguete, E. García, S. Luis, Residence time distribution, a simple tool to understand the behaviour of polymeric mini-flow reactors, *RSC Advances*, **2012**, *2*, 8721–

5.2. Procedimientos generales y datos experimentales

5.2.1. Diseño experimental I

En este apartado se describe el procedimiento general llevado a cabo para la reacción “ct_tfm_rm_1”. El mismo fue empleado en todas las reacciones del Diseño experimental I, con las variaciones de parámetros presentadas en el apartado 4.2.1.

En un tubo de microondas, a una disolución de laurato de metilo (590 μ l, 2.4 mmol, 1eq.), GlyF (207 μ l, 2.4 mmol, 1eq.) y MTHF seco (1.86 ml, 18.57 mmol, 70% v/v) se le adicionó PTSA (0.05 g, 0.29 mmol, 10% w/w FAME). A continuación, se lo calentó en microondas (Modo: “*Dynamic*”, 100 °C, 40 W) durante 120 min. Acabada la reacción, se dejó enfriar y se tomó una muestra de 1 ml, pasándola con un microfiltro a un vial de cromatografía de 2 ml para su posterior análisis.

5.2.2. Diseño experimental II

En este apartado se describe el procedimiento general llevado a cabo para la reacción “ct_tfm_rm_1_E”. El mismo fue empleado en todas las reacciones del Diseño experimental II, con las variaciones de parámetros presentadas en el apartado (4.2.2.).

En un balón de 50 ml, a una disolución de metli laurato (288 μ l, 1.17 mmol, 1eq.), GlyF (102 μ l, 1.17 mmol, 1eq.) y MTHF seco (1.92 μ l, 19.17 mol, 83% v/v) se le adicionó Novozym 435 (288 g, 1:1 w/w FAME). A continuación, se la calentó en una plancha de calentamiento a 45 °C con el control de un termómetro auxiliar y agitación magnética durante 24 horas. Terminada la reacción, se la dejó enfriar y se tomó una muestra de 1 ml, pasándola con un microfiltro a un vial de cromatografía de 2 ml, para su posterior análisis.

5.2.3. Diseño experimental III

En este apartado se describe el procedimiento general llevado a cabo para la reacción “cd_tfm_rm_1_S”. El mismo fue empleado en todas las reacciones del

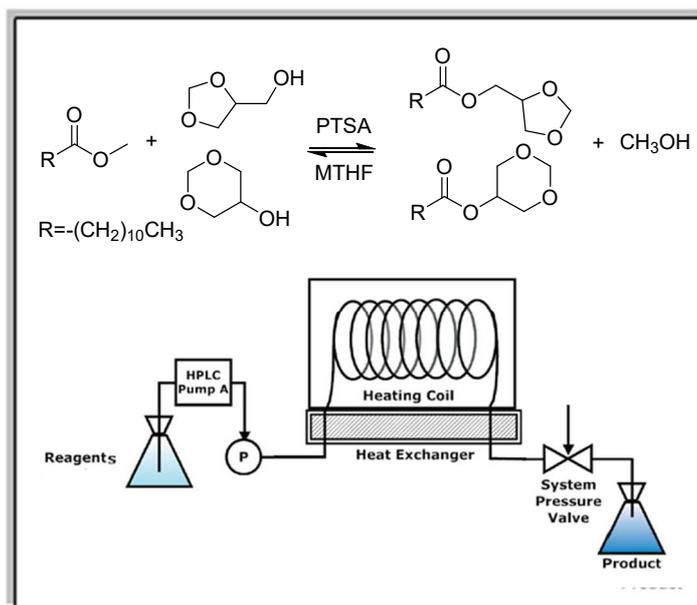
Diseño experimental III, con las variaciones de parámetros presentadas en el apartado (4.2.3.).

En un tubo de microondas, a una disolución de laurato de metilo (590 μ l, 2.4 mmol, 1eq.), GlyF (688 μ l, 7.2 mmol, 1eq.) y MTHF seco (1.86 ml, 18.57 mmol, 70% v/v), se la calentó en microondas (Modo: “*Dynamic*”, 100 °C, 40 W) durante 120 min. Acabada la reacción, se dejó enfriar y se tomó una muestra de 1 ml, pasándola con un microfiltro a un vial de cromatografía de 2 ml para su posterior análisis.

5.2.4. Sistema de flujo continuo I

En este apartado se describe el procedimiento general llevado a cabo para la reacción “ct_tfm_rf_T_1”. El mismo fue empleado en todas las reacciones del Sistema de flujo continuo I, con las variaciones de parámetros presentadas en el apartado (4.3.1.).

En un horno de cromatografía (KNK 3000 HRGC) a 110 °C, por un serpentín de acero inoxidable (1/8 in, 4 m), se hicieron circular 100 ml de una disolución de laurato de metilo (24 ml, 0.1 mol, 1eq.), GlyF (26 ml, 0.3 mol, 3eq.), MTHF seco (50 ml, 0.5 mol, 50% v/v) y PTSA (1.25 g, 7.27 mmol, 6% w/w FAME), utilizando una bomba de HPLC (Jasco PU-2080 Plus), programada con un flujo de 0.5 ml/min. A la salida del horno se empleó una válvula de aguja configurada para alcanzar 100 bares de presión (Esquema 12). Finalmente, pasados por el sistema 75 ml de disolución se tomaron muestras de 1 ml, pasándola con un microfiltro a un vial de cromatografía de 2 ml, para su posterior análisis.

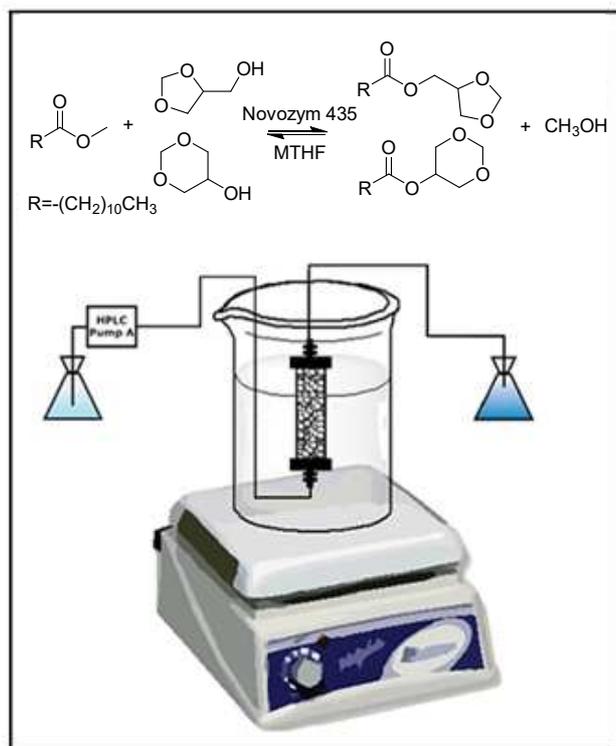


Esquema 12: Configuración de flujo continuo empleado para catálisis ácida con PTSA (ANEXO D).

5.2.5. Sistema de flujo continuo II

En este apartado se describe el procedimiento general llevado a cabo para la reacción "ct_tfm_rf_f_1_E". El mismo fue empleado en todas las reacciones del Sistema de flujo continuo II, con las variaciones de parámetros presentadas en el apartado (4.3.2.).

En una columna de vidrio (12 10 mm, con un volumen ajustable de 1 a 12 ml) empaquetada con 3.6 g de Novozym 435, se hicieron circular 30 ml de una disolución de laurato de metilo (10 ml, 4 mmol, 1eq.), GlyF (11 ml, 12 mmol, 3eq.) y MTHF seco (9 ml, 8.9 mol, 30% v/v), utilizando una bomba de HPLC (Jasco PU-2080 Plus), programada con un flujo de 0.5 ml/min. La columna fue sumergida en su totalidad en un baño María, calentada con una plancha con agitación magnética a 47°C (Esquema 13). Finalmente, pasados por el sistema los primeros 15 ml de disolución se tomaron muestras de 1 ml, pasándola con un microfiltro a un vial de cromatografía de 2 ml, para su posterior análisis.

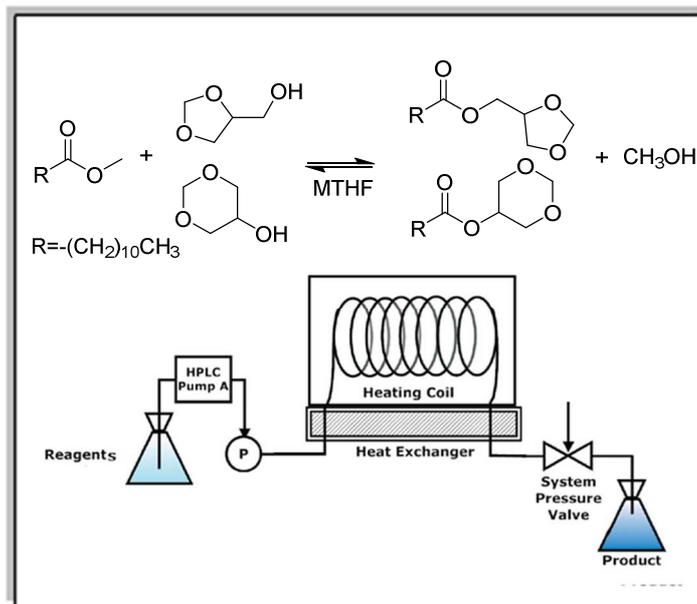


Esquema 13: Configuración de flujo continuo empleado para catálisis enzimática soportada con Novozym 435 (ANEXO D).

5.2.6. Sistema de flujo continuo III

En este apartado se describe el procedimiento general llevado a cabo para una reacción ejemplo del proceso. El mismo fue empleado en todas las reacciones del Sistema de flujo continuo III, con las variaciones de parámetros presentadas en el apartado (4.3.3.).

En un horno de cromatografía (KNK 3000 HRGC) a 110 °C, por un serpentín de acero inoxidable (1/8 in, 4 m), se hicieron circular 100 ml de una disolución de laurato de metilo (24 ml, 0.1 mol, 1eq.), GlyF (26 ml, 0.3 mol, 3eq.) y MTHF seco (50 ml, 0.5 mol, 50% v/v), utilizando una bomba de HPLC (Jasco PU-2080 Plus), programada con un flujo de 0.5 ml/min. A la salida del horno se empleó una válvula de aguja configurada para alcanzar 100 bares de presión (Esquema 14). Finalmente, pasados por el sistema 75 ml de disolución se tomaron muestras de 1 ml, pasándola con un microfiltro a un vial de cromatografía de 2 ml, para su posterior análisis.



Esquema 14: Configuración de flujo continuo sin catalizador (ANEXO D).

6. Conclusiones

A partir del trabajo de investigación realizado, con los resultados presentados y tomando en cuenta los objetivos planteados, se presentan las siguientes conclusiones:

6.1. La correcta selección de productos de partida, métodos de caracterización y el desarrollo de un nuevo y económico dispositivo RTD, permitió llevar a cabo un proceso de investigación secuencial exitoso, además de con esto cumplir con el onceavo principio de la química verde al desarrollar tecnologías analíticas para la monitorización en tiempo real de la reacción.

6.2. Se realizaron pruebas iniciales en “*batch*”, empleando tres rutas sintéticas diferentes e implantando tres modelos de diseño experimental para la optimización previa de la reacción y su posterior uso en sistemas de flujo continuo. Obteniendo rendimientos del 77, 65 y 14 %.

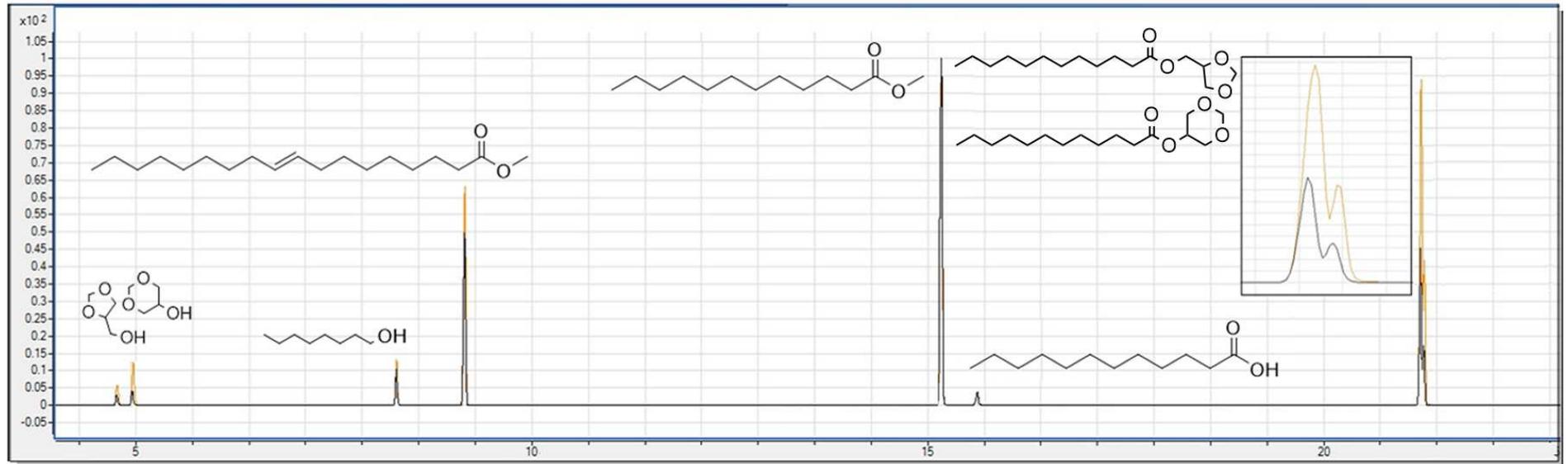
6.3. Se implementaron tres sistemas en flujo continuo, empleando los parámetros pre-optimizados y realizando ajustes necesarios como la temperatura, tiempo de residencia y carga del catalizador, para la optimización final de la reacción de transesterificación de esteres grasos de metilo. Para lo cual, se obtuvieron muy buenos rendimientos en dos de los sistemas (69 y 55 %), con rendimientos aptos para ser considerada su implementación a nivel industrial. Mejorando con esto la economía atómica de la síntesis clásica de biodiesel y eliminando un subproducto considerado como residuo en la misma.

6.4. Se realizó un análisis EcoScale de la reacción para los sistemas de flujo continuo que presentaron mayores rendimientos y se determinó que el nivel de implementación de los mismos se encuentra en un rango entre “excelente” y “aceptable” con puntajes de 75.35 y 66.50 respectivamente.

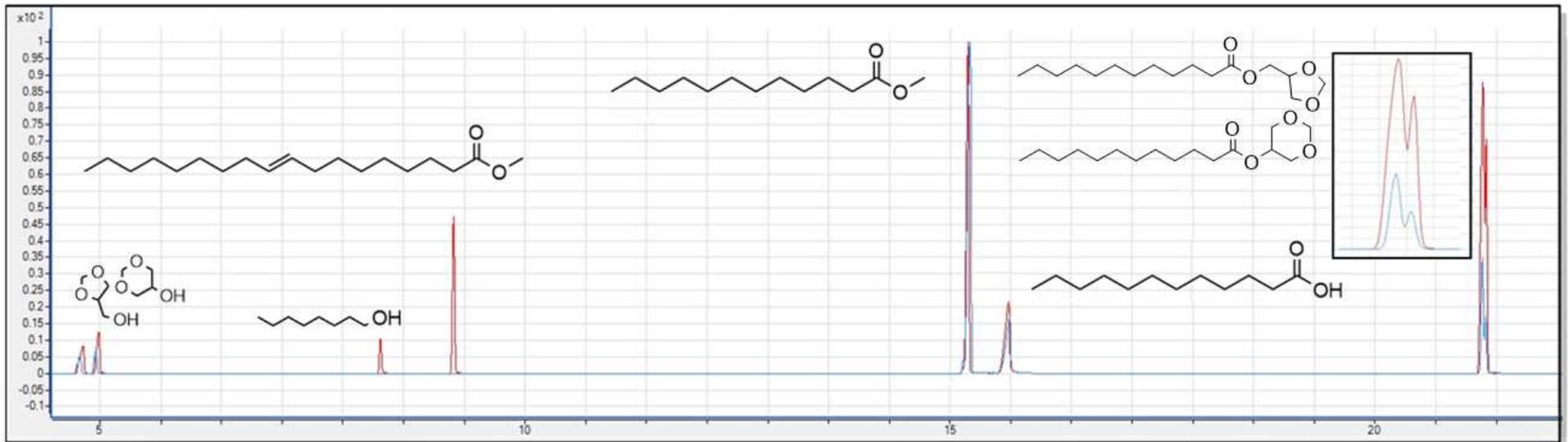
7. Material Suplementario

El material suplementario del presente trabajo se encuentra dividido en ANEXOS, los cuales se presentan a continuación.

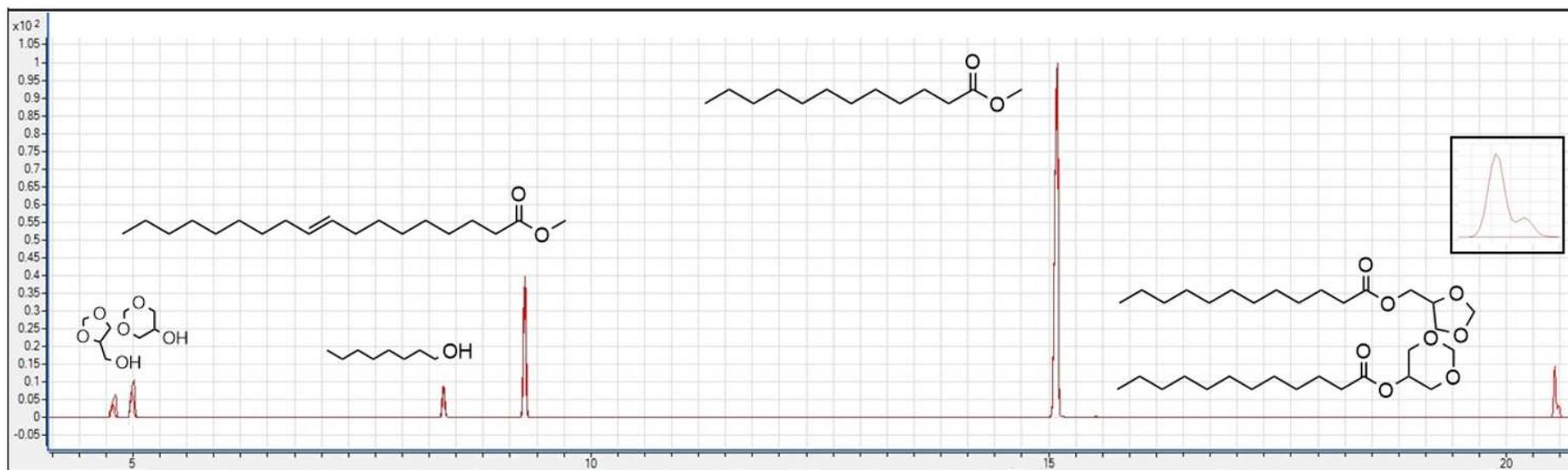
ANEXO A



Esquema 15: Comparación de cromatogramas de las etapas inicial (negro) y final (naranja) de optimización, parte del “Diseño experimental I”.



Esquema 16: Comparación de cromatogramas de las etapas inicial (azul) y final (rojo) de optimización, parte del “Diseño experimental II”.



Esquema 17: Comparación de cromatogramas de las etapas inicial (negro) y final (rojo) de optimización, parte del “Diseño experimental III”.

ANEXO B

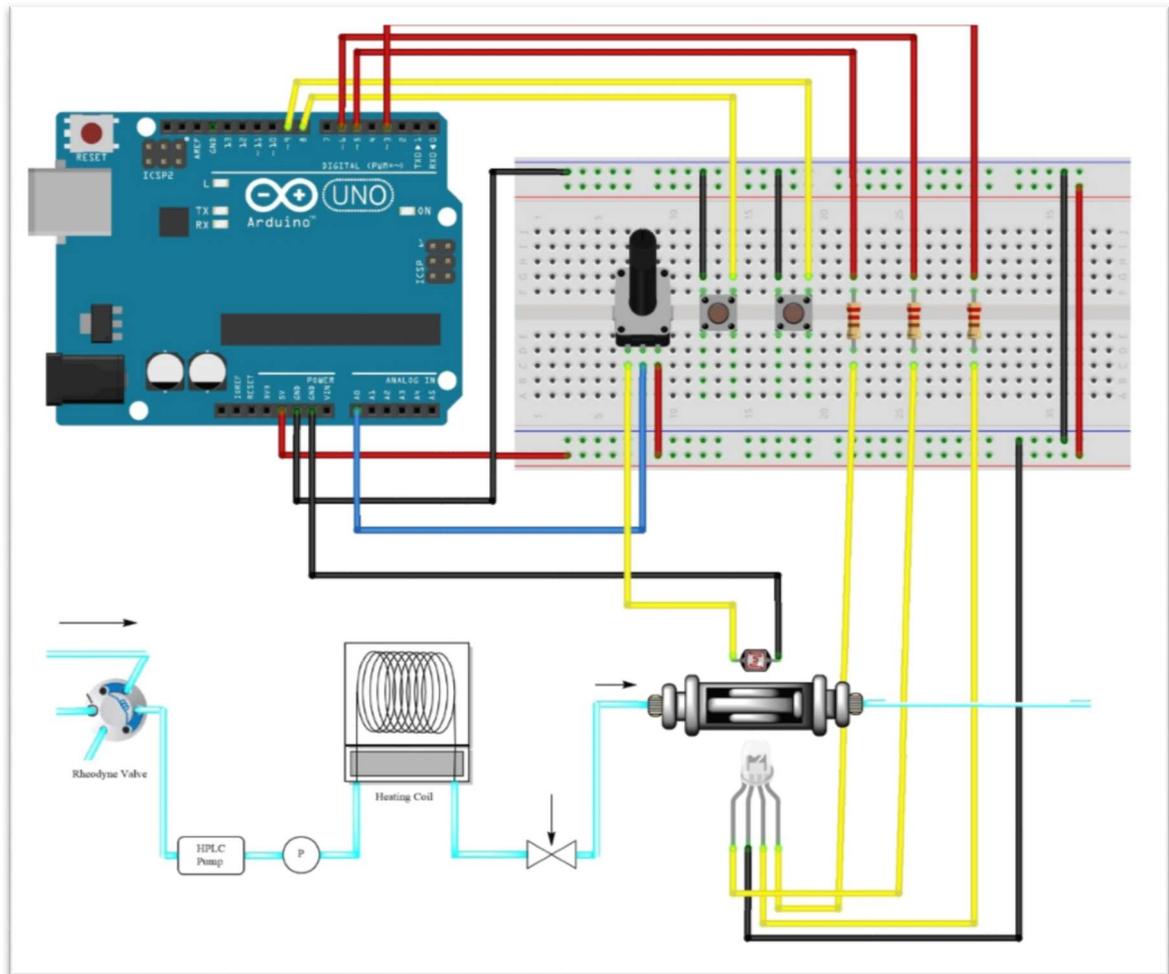
Tabla 20: EcoScale del “Sistema en flujo I”.

The penalty points to calculate the EcoScale				
Parameter	Penalty points	Check	Puntos	Observación
1. Yield	$(100 - \% \text{ yield})/2$		15,65	Rendimiento de la reacción 69%.
2. Price of reaction components (to obtain 10 mmol of end product)				
Inexpensive (< \$10)	0		0	Materias primas provenientes de residuos.
Expensive (> \$10 and < \$50)	3			
Very expensive (> \$50)	5			
3. Safety^a				
N (dangerous for environment)	5			
T (toxic)	5			
F (highly flammable)	5			
E (explosive)	10			
F+ (extremely flammable)	10			
T+ (extremely toxic)	10			
4. Technical setup				
Common setup	0		0	
Instruments for controlled addition of chemicals ^b	1			
Unconventional activation technique ^c	2			
Pressure equipment, > 1 atm ^d	3		3	
Any additional special glassware	1			
(Inert) gas atmosphere	1			
Glove box	3			
5. Temperature/time				
Room temperature, < 1 h	0		0	
Room temperature, < 24 h	1			
Heating, < 1 h	2			
Heating, > 1 h	3		3	
Cooling to 0°C	4			
Cooling, < 0°C	5			
6. Workup and purification				
None	0			
Cooling to room temperature	0			
Adding solvent	0		0	
Simple filtration	0			
Removal of solvent with bp < 150°C	0		0	
Crystallization and filtration	1			
Removal of solvent with bp > 150°C	2			
Solid phase extraction	2			
Distillation	3		3	
Sublimation	3			
Liquid-liquid extraction ^e	3			
Classical chromatography	10			
		Total:	24,65	
		EcoScale:	75,35	

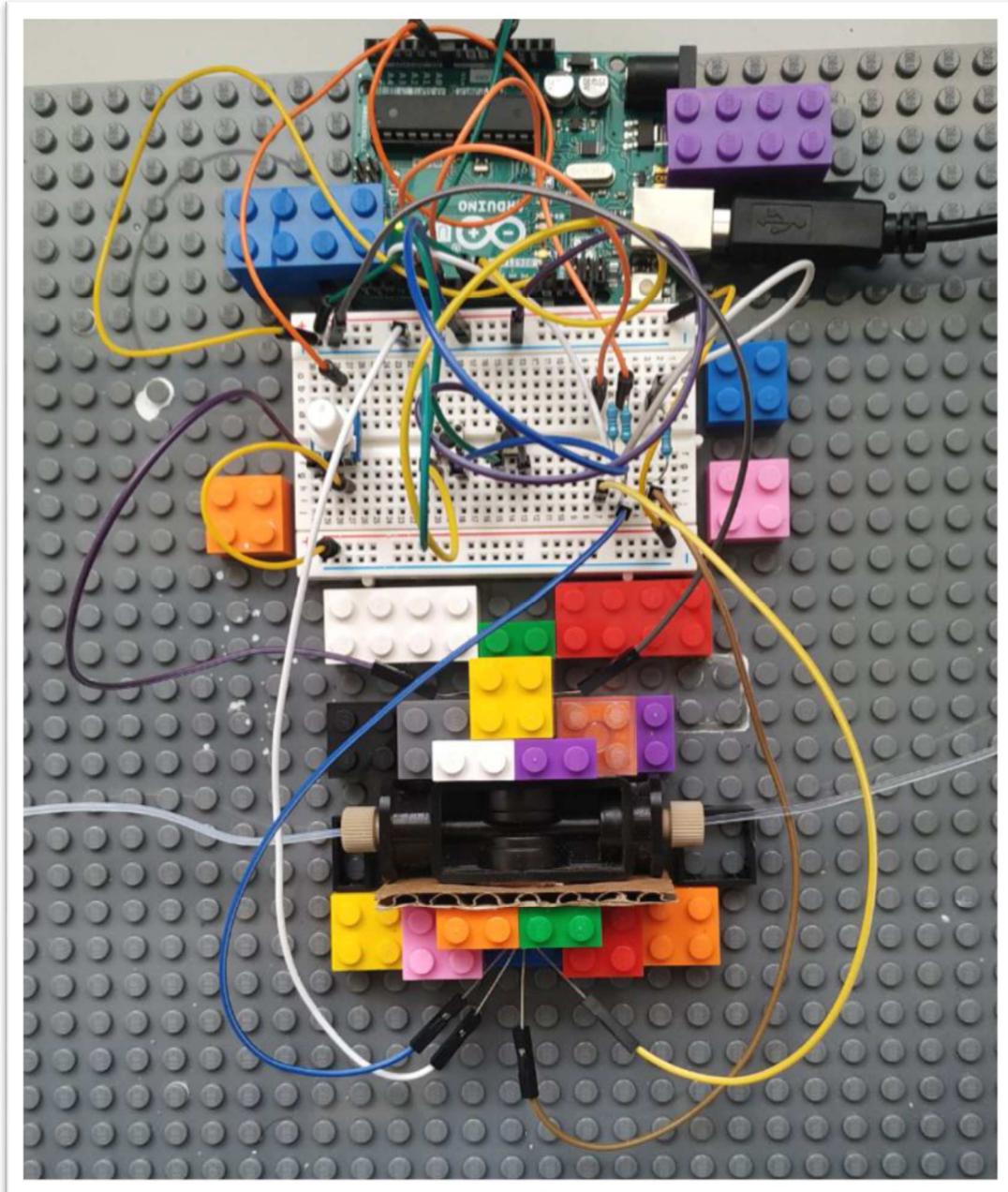
Tabla 21: EcoScale del “Sistema en flujo II”.

The penalty points to calculate the EcoScale				
Parameter	Penalty points	Check	Puntos	Observación
1. Yield	$(100 - \% \text{ yield})/2$		22,5	Rendimiento de la reacción 55%.
2. Price of reaction components (to obtain 10 mmol of end product)				
Inexpensive (< \$10)	0			
Expensive (> \$10 and < \$50)	3			
Very expensive (> \$50)	5		5	Catalizadores enzimáticos costosos.
3. Safety^a				
N (dangerous for environment)	5			
T (toxic)	5			
F (highly flammable)	5			
E (explosive)	10			
F+ (extremely flammable)	10			
T+ (extremely toxic)	10			
4. Technical setup				
Common setup	0		0	
Instruments for controlled addition of chemicals ^b	1			
Unconventional activation technique ^c	2			
Pressure equipment, > 1 atm ^d	3		3	
Any additional special glassware	1			
(Inert) gas atmosphere	1			
Glove box	3			
5. Temperature/time				
Room temperature, < 1 h	0		0	
Room temperature, < 24 h	1			
Heating, < 1 h	2		2	
Heating, > 1 h	3			
Cooling to 0°C	4			
Cooling, < 0°C	5			
6. Workup and purification				
None	0			
Cooling to room temperature	0			
Adding solvent	0		0	
Simple filtration	0			
Removal of solvent with bp < 150°C	0		0	
Crystallization and filtration	1			
Removal of solvent with bp > 150°C	2			
Solid phase extraction	2			
Distillation	3		3	
Sublimation	3			
Liquid-liquid extraction ^e	3			
Classical chromatography	10			
		Total:	33,5	
		EcoScale:	66,5	

ANEXO C



Esquema 18: Circuito del dispositivo fotosensible empleado para calcular tiempos de residencia en sistemas de flujo continuo.



Esquema 19: Fotografía del dispositivo fotosensible empleado para calcular tiempos de residencia en sistemas de flujo continuo.

Bill of Materials

Assembly List

Tabla 22: Assembly List.

Label	Part Type	Properties
Componente1	Arduino Uno (Rev3)	Tipo Arduino UNO (Rev3)
LED2	RGB LED (com. cathode, rgb)	rgb RGB; polarity common cathode; pin order rgb; paquete 5 mm [THT]
R2	220Ω Resistor	tolerancia ±5%; bands 4; Resistencia 220Ω; espacio entre pines 400 mil; paquete THT
R4	PHOTOCELL	Variante pth-kit; paquete photocell-kit
R5	220Ω Resistor	tolerancia ±5%; bands 4; Resistencia 220Ω; espacio entre pines 400 mil; paquete THT
R6	220Ω Resistor	tolerancia ±5%; bands 4; Resistencia 220Ω; espacio entre pines 400 mil; paquete THT
R7	Rotary Potentiometer (Small)	Tipo Rotary Shaft Potentiometer; máxima resistencia 10kΩ; track Linear; tamaño Rotary - 9mm; paquete THT
S1	Pushbutton	paquete [THT]
S2	Pushbutton	paquete [THT]

Programación Arduino

```
int verde = 5;
int azul = 3;
int buttonApin = 9;
int buttonBpin = 8;
byte leds = 0;
byte sen1vol = 0;
String envia="";
byte sen2luz = 0;
void setup()
{
  pinMode(rojo, OUTPUT);
  pinMode(verde, OUTPUT);
  pinMode(azul, OUTPUT);
  pinMode(buttonApin, INPUT_PULLUP);
  pinMode(buttonBpin, INPUT_PULLUP);
  pinMode(sen1vol,INPUT);
  pinMode(A0,INPUT);
  pinMode(sen2luz,INPUT);
  pinMode(A1,INPUT);
  Serial.begin(9600);
}
void loop()
{
  if (digitalRead(buttonApin) == LOW)
  {
    digitalWrite(rojo, 255);
    digitalWrite(verde, 0);
    digitalWrite(azul, 0);
    // valores para diferentes colores básicos
    // rojo: 255,0,0
```

```
//verde 0,255,0
//azul 0,0,255
// blanco 255,255,255
// Para generar colores deseados tomar composicion RGB del phtoshop
}
if (digitalRead(buttonBpin) == LOW)
{
  digitalWrite(rojo, LOW);
  digitalWrite(verde, LOW);
  digitalWrite(azul, LOW);
}
//sensor 1-----
envia.concat(analogRead(A0));
envia.concat(" ");
//sensor 2-----
envia.concat(analogRead(A1));
envia.concat(" ");
//sensor 3-----
//sensor 4-----
Serial.println(envia);
  envia="";
delay(500);
}
```

ANEXO D



Esquema 20: Fotografía del sistema de flujo continuo representado en los Esquema 12 y Esquema 14.



Esquema 21: Fotografía del sistema de flujo continuo representado en el Esquema 13.