



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

***“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN
FORMA DE MONOGLICÉRIDO MEDIANTE CATÁLISIS
HETEROGÉNEA”***

TESIS DOCTORAL

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Juan Calero Mármol', is written over a horizontal line.

JUAN CALERO MÁRMOL

TITULO: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE
MONOGLICERIDO MEDIANTE CATALISIS HETEROGENEA.

AUTOR: *Juan Calero Mármol*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Optimización del proceso de obtención de biocombustibles que integran la glicerina en forma de monoglicérido mediante catálisis heterogénea

DOCTORANDO/A: Juan Calero Mármol

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Como Directores de esta Tesis Doctoral consideramos que durante el desarrollo de la misma, el doctorando ha adquirido las habilidades y competencias necesarias para obtener el título de Doctor, y que el trabajo desarrollado constituye una aportación relevante en el campo de la producción de biocombustibles que integran la glicerina. Estas afirmaciones se apoyan en los siguientes puntos:

1. El doctorando ha superado con buen aprovechamiento los créditos correspondientes a la formación teórico-práctica de la parte formativa del Programa de Doctorado de Química Fina (Máster en Química Fina Avanzada).
2. El doctorando ha adquirido una sólida formación en las técnicas instrumentales y metodologías que han sido utilizadas durante el desarrollo de la extensa labor experimental asociada a esta Tesis Doctoral.
3. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar estos biocombustibles en mezclas con el diesel fósil en porcentajes cercanos al 80%. A los catalizadores se les ha estudiado la capacidad de reutilización para comprobar la viabilidad económica de la reacción de transesterificación parcial.
4. Como resultado de la labor desarrollada directamente relacionada con esta Tesis Doctoral, se han presentado 5 comunicaciones en congresos nacionales, 8 en congresos internacionales, 8 capítulos de libro y 6 artículos en revistas científicas de elevado índice de impacto.
5. El doctorando ha participado activamente en el proyecto ENE 2011-27017 sobre "Producción de un nuevo tipo de biodiesel que integra la glicerina, mediante la aplicación de lipasas", en el

que han participado los departamentos de Química Orgánica, Microbiología y Bioquímica de la Universidad de Córdoba. Además, gracias al fruto de las investigaciones de este proyecto, el doctorando obtuvo una beca del ceiA3 para realizar una estancia de 3 meses en un centro internacional de prestigio (Combustion Chemistry Centre, NUIG), con la que puede adquirir el título de Doctor internacional.

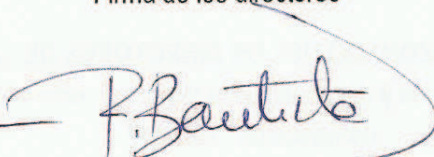
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de Marzo de 2015

Firma de los directores



Fdo.: Diego Luna Martínez



Fdo.: Felipa M.ª Bautista Rubio



Fdo.: Cristóbal Verdugo Escamilla

D. Antonio Ángel Romero Reyes, Director del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Investigación titulado "**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE MONOGLICÉRIDO MEDIANTE CATÁLISIS HETEROGÉNEA**" que constituye la Memoria presentada por D. Juan Calero Mármol para optar al Grado de Doctor por el Programa de Doctorado de Química Fina, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica, bajo la dirección de los profesores Dres. D. Diego Luna Martínez, Dña. Felipa M^a Bautista Rubio y D. Cristóbal Verdugo Escamilla.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Córdoba a 26 de Marzo de 2015.



Fdo: D. Antonio Ángel Romero Reyes

AGRADECIMIENTOS

*a mi Familia,
a Eva.*

Después de todo el tiempo que me ha llevado llegar a este punto, finalmente estoy aquí. Ha sido un largo camino pasando por una ingeniería técnica (con la que creí que terminaría de estudiar), hasta dos másters, un grado y por último, la deseada tesis doctoral. Este largo camino no lo hubiese conseguido sin el apoyo incondicional de los míos, los familiares de toda la vida y los que se van uniendo, haciendo mi familia cada vez más numerosa.

Me gustaría agradecer a toda persona que se haya interesado por el transcurso de esta tesis doctoral, preguntando cómo va y cuándo se terminará, animándome así a conseguir dicho objetivo. En especial a mis compañeros durante la tesis (Alfonso, Alejandro, Carlos, Carmen, Checa, Elena, Fátima, Fran, Gema, Kaquisco, Lucre, Manolos, Marisa, Rafas, Susana y Vicente), todos estando siempre dispuestos a ayudarme cuando lo necesitaba. “Also, I would like to mention to the National University of Ireland, Galway, where I did my stay abroad. There my partners were really nice with me, overall Henry, Colin, Yang and John”. Para terminar, tengo que agradecer a mis directores de la tesis que me han tenido que aguantar en todo momento. Al Profesor Diego Luna, que gracias a él no me quedé en la ingeniería técnica, sino que finalmente he llegado a este punto. La Profesora Felipa M. Bautista a la que tengo que agradecer tanto por la tesis como por el proyecto de innovación docente. Y por supuesto a Cristóbal Verdugo, que me ha ayudado mucho para realizar los estudios estadísticos ANOVA que me han dado muchos quebraderos de cabeza... ¡Gracias a los tres!

No puedo dejar atrás a todo el personal del departamento de Química Orgánica y de Microbiología de la UCO por dejarme utilizar sus instalaciones y ayudarme de alguna forma a que este proyecto llegara a buen puerto. Tengo que dar las gracias a José María Marinas, por dejarme formar parte de su grupo de investigación, así como a Francisco J. Urbano y Antonio A. Romero, que han sido los directores del departamento durante el transcurso de mi tesis, permitiéndome hacer todo el trabajo experimental de la misma. Tampoco quiero olvidar a Enrique D. Sancho que me ha orientado en mi trabajo en las instalaciones del departamento de Microbiología y que fue co-Director de mi TFM del máster de Química Fina y me ha dirigido la tesis hasta su jubilación.

Ya que esto es el punto final de una larga trayectoria, me gustaría mencionar a mis directores de la Ingeniería Técnica y el Grado en Ingeniería, José M. Fernández y Manuel Cruz que fue un placer trabajar con ellos en ambos proyectos. Por supuesto a Marta Varo, directora

del Máster de Profesorado, que ha conseguido que no sólo me interese por la docencia, sino también por la investigación en docencia.

Mención especial merecen mis padres los cuales, siempre están pendientes de mí y se sienten orgullosos de que consiga lo que me propongo en la vida. Mi hermana que me demuestra constantemente que con esfuerzo todo se consigue, y que todo el mundo puede adaptarse a nuevas situaciones, y creo que ella lo está haciendo muy bien. También mencionar a mi hermano que ha sido y será siempre un gran ejemplo a seguir. Por supuesto, no me olvido de los nuevos de la familia, Bea y Pedro, dos grandes profesionales en sus respectivos campos, consiguiendo lo que se han propuesto, y mi primer sobrino, Daniel, el más guapo de todos, que espero que consiga todo lo que quiera, buenos ejemplos no le faltan.

Por último, tengo que mencionar a Eva, la única persona que está en todo momento (cuando estaba liado con la tesis y cuando intentaba despejarme un rato), la persona más importante en este camino, ya que es un gran apoyo para mí y es la que consigue que recupere la motivación cuando parece perdida. Mi motivación suele estar en niveles muy elevados, gracias a mi "suerte" (bastante conocida), pero es verdad que cuando caigo, no soy capaz de salir sin su ayuda... También mencionar a su familia al completo, padres, hermanos y por supuesto sobrinos, Aila y Saucó, a los que quiero un montón.

Gracias a todos de corazón...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1. Estado actual de los biocombustibles.....	37
1.2. Tecnologías para la producción de biocombustibles	39
1.2.1. Fortalezas, debilidades y obstáculos existentes para la fabricación industrial de las mezclas de FAME, que constituye en la actualidad el biodiesel convencional.....	43
1.2.2. Biocombustibles obtenidos por hidro-procesamiento de aceites y grasas en las plantas de refino de petróleo actuales: Green Diesel.....	50
1.2.3. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de diversos derivados del glicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.....	54
1.2.4. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de triacetato de glicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.....	56
1.2.5. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de ésteres de carbonato de glicerol de ácidos grasos en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.....	58
1.2.6. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de monoacilglicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.....	61
1.2.7. Perspectivas para el futuro.....	64
1.3. Enzimas.....	69
1.3.1. Evolución histórica.....	71
1.3.2. Clasificación y nomenclatura.....	72
1.3.3. Catálisis enzimática en disolvente orgánicos	74
1.3.4. Estructura y mecanismo de acción de las lipasas.....	94
1.3.5. Efecto del agua en la actividad catalítica.....	97
1.4. Catalizadores básicos heterogéneos	99
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	107
2.1. Métodos de análisis	110
2.2. Materia prima utilizada	118

2.2.1. Aceite de girasol	118
2.2.2. Lipasa <i>Rhizomucor miehei</i>	120
2.2.3. Sistema KF soportado	136
2.2.4. Óxido de calcio	136
2.3. Diseño experimental en las reacciones de transesterificación	139
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143
3.1. Evaluación de la capacidad de las mezclas directas aceite/diesel para reemplazar el diesel fósil	146
3.2. Lipasa <i>Rhizomucor Miehei</i>	149
3.2.1. Determinación de la influencia del medio de reacción en la actividad de la lipasa libre <i>Mucor miehei</i> y de la inmovilizada comercial <i>Rhizomucor miehei</i>	149
3.2.2. Influencia de los diferentes parámetros de reacción en la actividad de la lipasa libre <i>Mucor miehei</i>	152
3.2.3. Influencia de los diferentes parámetros de reacción en la actividad de la lipasa inmovilizada comercial <i>Rhizomucor miehei</i>	155
3.2.4. Estudio de la inmovilización física de la lipasa inmovilizada comercial <i>Rhizomucor miehei</i>	162
3.2.5. Análisis de multivarianza ANOVA	167
3.3. Sistemas KF soportado	186
3.3.1. Influencia del sólido empleado como soporte de los sistemas KF soportado	186
3.3.2. Influencia del peso de catalizador KF/Al ₂ O ₃	188
3.3.3. Influencia de la relación molar aceite/metanol en el catalizador KF/Al ₂ O ₃	191
3.3.4. Influencia de la temperatura sobre el sistema KF/Al ₂ O ₃	192
3.3.5. Influencia del contenido de agua en el medio de reacción	196
3.3.6. Posibilidad de reutilización de los 3 sistemas catalíticos KF soportados	198
3.4. Óxido de Calcio	202
3.4.1. Influencia del tiempo de reacción	202
3.4.2. Influencia de la cantidad de catalizador	204
3.4.3. Influencia de la temperatura	205

3.4.4. Influencia de la relación aceite/metanol	208
3.4.5. Influencia de la presencia de agua en el medio de reacción	209
3.4.6. Reutilización de los catalizadores de CaO	214
3.4.7. Análisis de Multivarianza ANOVA	216
4. CONCLUSIONES.....	239
5. REFERENCIAS.....	255
6. ANEXOS	285
6.1. Glosario	287
6.2. Memoria de la estancia en la NUI Galway	289
6.3. Otras aportaciones científicas	300

RESUMEN

Los elevados precios de los combustibles derivados del petróleo, y la certeza de su carácter finito, están ocasionando una intensificación en la investigación tanto de nuevos métodos de producción de biocombustibles, como en la optimización de los métodos ya existentes para la producción de combustibles de origen no fósil.

Actualmente, para la producción de biodiesel se emplean de forma generalizada catalizadores en fase homogénea, como NaOH o KOH. Estos procesos que utilizan catálisis homogénea presentan todos los inconvenientes intrínsecos de la catálisis homogénea, y además, generan sales y glicerina de baja calidad como subproducto.

Una de las posibles soluciones a este problema y objetivo principal de esta tesis doctoral, es la producción de un nuevo tipo de biodiesel, denominado Ecodiesel, que integre la glicerina en forma de monoglicérido. De esta forma se evita el problema de la obtención de glicerina y se incrementa asimismo el rendimiento atómico del proceso, ya que toda la materia prima reaccionante se transforma en biocombustible.

La utilización, tanto de lipasas 1,3-selectivas inmovilizadas, y de catalizadores heterogéneos alcalinos como el CaO o el KF soportado, controlando cinéticamente la reacción, permiten llevar a cabo la reacción de transesterificación de un mol de triglicérido (TG) con etanol absoluto (para la lipasa) o metanol (para los catalizadores heterogéneos), obteniendo dos moles de éster etílico o metílico de ácidos grasos (biodiesel) y un mol de monoglicérido (MG), evitándose así la obtención de glicerina.

En la actualidad, la glicerina se gestiona prácticamente como un residuo, que además puede ocasionar graves problemas en los motores, si no ha sido eliminada totalmente de la mezcla empleada como biocombustible. Por lo que, la aplicación de éste método simplificaría enormemente el proceso de producción, ahorrando el gran consumo de agua necesario para eliminar la glicerina, tal como se produce con la utilización del método estándar.

SUMMARY

The high prices of petroleum fuels are causing an increase of research about new methods to produce biofuels, such as optimization of the process with non-fossil fuel methods.

Currently, to produce biodiesel is generally employed in homogeneous phase catalyst such as NaOH or KOH. These homogeneous catalysis processes using generate low quality glycerol by-product.

One of the possible solutions to this problem and main objective of this thesis is the production of a new type of biodiesel, called Ecodiesel, which integrates glycerol as monoglyceride. Thus, this method avoids obtaining glycerol and also increases atomic performance of the process since all raw materials are transformed into biofuel reaction.

The use of 1,3-selective immobilized lipase under optimal conditions, and heterogeneous catalysts kinetically controlling the reaction, allows carrying out the transesterification reaction of one mole of triglyceride (TG) with absolute ethanol (using lipase) or methanol (using heterogeneous catalysts), obtaining two moles of FAEE or FAME (biodiesel) and one mole of the monoglyceride (MG), thus avoiding the production of glycerol.

Nowadays, the glycerol is considered practically like a residue, which can also cause serious engine problems if not removed entirely from the mixture used as biofuel. So, the application of this novel method greatly simplify the production process, saving the large consumption of water required to remove glycerin, such as occurs with the use of the standard method.

OBJETIVOS

En la actualidad el desarrollo de procesos respetuosos con el medio ambiente y que utilizan materias primas renovables es un campo que está recibiendo cada vez mayor atención, dadas las nuevas tendencias económicas y ambientales de recurrir a procesos innovadores, para la fabricación de productos químicos que cubran eficientemente las necesidades del mercado, en una concepción sostenible de producción industrial.

El elevado consumo actual de petróleo, que se encuentra alrededor de los 90 millones de barriles por día, llevará en un plazo no muy largo al agotamiento de los combustibles fósiles. Esto nos lleva a la necesidad de encontrar biocombustibles que además de renovables, permitan funcionar bien en los motores actuales, sin necesidad de modificación alguna.

En este contexto, nuestro grupo de investigación viene estudiando desde hace más de una década, la posibilidad de producir biocombustibles similares al biodiesel convencional, utilizando diferentes lipasas 1,3-selectivas dando lugar a una etanolisis parcial, evitando de esta manera la producción de glicerina. Esta metodología, desarrollada en el Departamento de Química Orgánica ha sido recogida en dos patentes propiedad de la Universidad de Córdoba.

En este trabajo se pretende aplicar la metodología indicada a la obtención de biocombustibles que integran la glicerina como monoglicérido, mediante el empleo de catálisis heterogénea, tanto con la lipasa *Rhizomucor Miehei* inmovilizada, como con sistemas KF soportados (en ZnO, MgO y Al₂O₃), y el CaO puro. Por tanto, se pretenden cubrir los siguientes objetivos:

(a) Evaluar la posible inmovilización de la lipasa *Rhizomucor Miehei* (tanto la libre como la inmovilizada comercial) en soportes inorgánicos, para aplicarla en la reacción de transesterificación de aceite de girasol para la obtención del combustible denominado "Ecodiesel".

(b) Estudiar la aplicación del sistema KF soportado en ZnO, MgO y Al₂O₃ y valorar el comportamiento de estos catalizadores soportados, para la obtención del Ecodiesel.

(c) Síntesis del Ecodiesel mediante la aplicación de un catalizador heterogéneo menos activo que los metales alcalinos como es el CaO, para la obtención de Ecodiesel.

(d) Comprobar la viabilidad de todos los catalizadores estudiados en función de su capacidad de reutilización.

PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo previsto para la realización de la presente tesis doctoral se resume en los siguientes puntos:

1) Selección de distintos catalizadores enzimáticos comerciales.

Para ello se procederá a evaluar algunas lipasas disponibles comercialmente, que han sido descritos para otros usos industriales, y valorar sus posibilidades para llevar a cabo la reacción de transesterificación parcial del aceite de girasol.

2) Preparación de los sistemas catalíticos soportados.

Se procederá a efectuar la inmovilización de la lipasa, tanto en forma covalente como por adsorción física. También se soportará el KF en soportes inorgánicos (ZnO, MgO, Al₂O₃).

2.1) Síntesis, funcionalización, activación y caracterización superficial de los soportes utilizados para la inmovilización.

2.2) Heterogeneización de la lipasa seleccionada y caracterización de los sistemas enzimáticos preparados.

2.3) Síntesis de los sistemas a base de KF inmovilizado en diferentes soportes inorgánicos.

3) Evaluación de los diferentes catalizadores seleccionados

Los catalizadores heterogéneos sintetizados, serán caracterizados mediante reacciones de transesterificación con aceite de girasol y etanol absoluto, o metanol, en distintas condiciones de reacción (peso de catalizador, temperatura, relación volumétrica aceite/alcohol, velocidad de agitación, contenido de agua del medio de reacción, etc.).

4) Evaluación de la posibilidad de reutilización de los distintos catalizadores.

Se emplearán las condiciones óptimas de cada catalizador para evaluar su posibilidad de reutilización y de esta manera, valorar sus posibilidades en la producción de biocombustibles que integran la glicerina en forma de monoglicérido.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estado actual de los biocombustibles

Actualmente los combustibles fósiles a nivel mundial son la principal fuente primaria de energía y de productos químicos. Sin embargo, debido a la demanda previsible, y para garantizar un modelo de desarrollo económico y social, todo el mundo acepta que su disponibilidad es cada vez más limitada, por lo que se asume que la era de los combustibles fósiles baratos y de fácil acceso está llegando a su fin. Por lo tanto, el alto consumo de petróleo actual, unos 90 millones de barriles de petróleo (Figura 1.1), conducirá inexorablemente al agotamiento de los combustibles fósiles. Así, la Agencia Internacional de Energía (AIE) ha informado, que se prevé que la necesidad de energía primaria en el mundo crecerá un 55% entre 2005 y 2030, y cerca de 2025, la demanda mundial de petróleo se disparará hasta el 60%, mientras que la capacidad de producción puede experimentar una recaída a los niveles de 1985 [1].

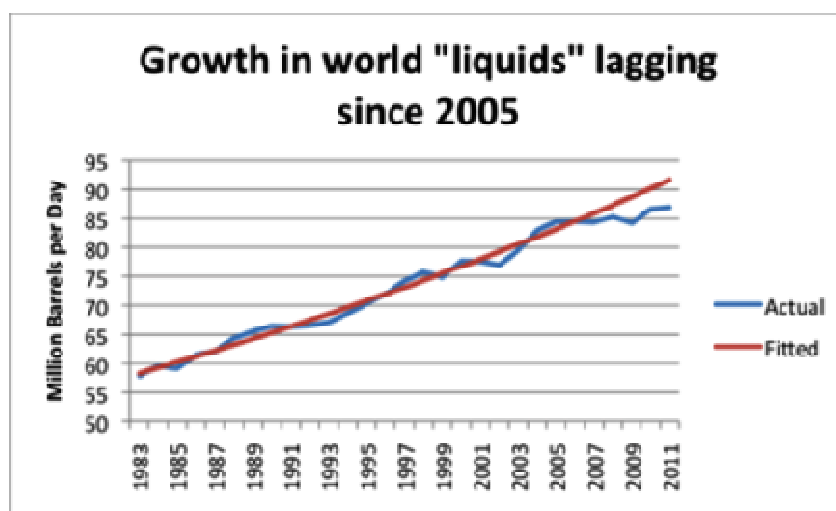


Figura 1.1. El consumo de petróleo en los últimos 20 años. Fuente: AIE International Petroleum Monthly.

En este sentido, se estima que dentro de 50 años, en algunos países las reservas de petróleo se agotarán, y los restantes lugares, actualmente en explotación, serán de difícil acceso (a gran profundidad y/o en los océanos). Así que, inevitablemente se imagina un escenario de creciente escasez mundial, lo que causaría un aumento gradual de los precios del combustible con potencial impacto muy negativo en la economía de muchos países. En resumen, los avances tecnológicos, la reducción de las reservas potenciales, y el aumento de la explotación conduce a la inseguridad energética, agravando además el cambio climático debido al aumento de gases de efecto invernadero (GEI) debido al consumo de energía a un ritmo mayor. El uso de

combustibles fósiles es ahora ampliamente aceptado como insostenible debido al agotamiento de los recursos y la acumulación de GEI en el medio ambiente que ya han superado “peligrosamente” el umbral de 450 ppm CO₂ [2]. Con el aumento de las emisiones de GEI antropogénicos y el agotamiento de las reservas fósiles, principalmente debido al uso a gran escala de combustibles fósiles para el transporte, la electricidad y la generación de energía térmica, se ha vuelto cada vez más importante adoptar políticas para promover las fuentes de energía renovables, que son capaces de reducir la dependencia de las reservas fósiles y también para mantener la sostenibilidad ambiental y económica.

Por lo tanto, existe una creciente preocupación en todo el mundo para la protección del medio ambiente y para la conservación de los recursos naturales no renovables, por lo que se está haciendo un esfuerzo sin precedentes para implementar alternativas (fotovoltaica, eólica, el hidrógeno y la energía nuclear) [3,4] que permitan la sustitución gradual de gas natural, el carbón y los combustibles fósiles en el campo de la generación de electricidad. Pero no hay tal equivalente en el transporte, ya que los vehículos capaces de utilizar las pilas de combustible o motores eléctricos no pueden competir todavía con los motores de explosión o de combustión, desarrollados a finales del siglo XIX y muy perfeccionados en el siglo siguiente. En el campo que más se nota esta diferencia es en la aviación. Por lo tanto, en el corto y medio plazo parece esencial obtener, alternativas viables ambientalmente, que sean capaces de sustituir a los combustibles fósiles actuales. Debido a esto, es urgente y necesario encontrar un sustituto que, siendo renovable, permita a los motores actuales trabajar sin ningún tipo de modificación [5]. También mencionar que el motor diesel, inventado por Rudolph Diesel hace más de un siglo trabajó primero con aceite de cacahuete, por lo que se acepta que los motores de combustión actuales están diseñados para funcionar con combustibles de hidrocarburos derivados del petróleo. Por lo tanto, un sustituto para el combustible diesel a partir de fuente renovable tendrá que tener propiedades idénticas o muy similares.

1.2. Tecnologías para la producción de biocombustibles

La tecnología más habitual de las existentes para la transformación de materias vegetales o aceites de origen animal en biocombustibles, se basa en la conversión de los componentes de los triglicéridos (TG) a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, del inglés Fatty Acid Methyl Ester) mediante transesterificación con metanol. Sin embargo, también existen varias rutas alternativas para la aplicación de aceites vegetales o grasas animales para la obtención de biocombustibles, incluyendo el uso directo del aceite vegetal, en microemulsiones y emulsificaciones. Además, los biocombustibles denominados "diesel renovable", (debido a que su composición se asemeja a la de los combustibles fósiles derivados del diesel de petróleo), ha ido ganando importancia en los últimos años. A este respecto, se utilizan varios procesos (craqueo o pirólisis, hidrodeshoxigenación y hidrotratamiento) para obtener estos biocombustibles que se asemejan a diesel de petróleo [6-8]. En la Figura 1.2 se muestran los principales métodos existentes para la transformación de triglicéridos en biocombustibles aplicables a motores diesel.

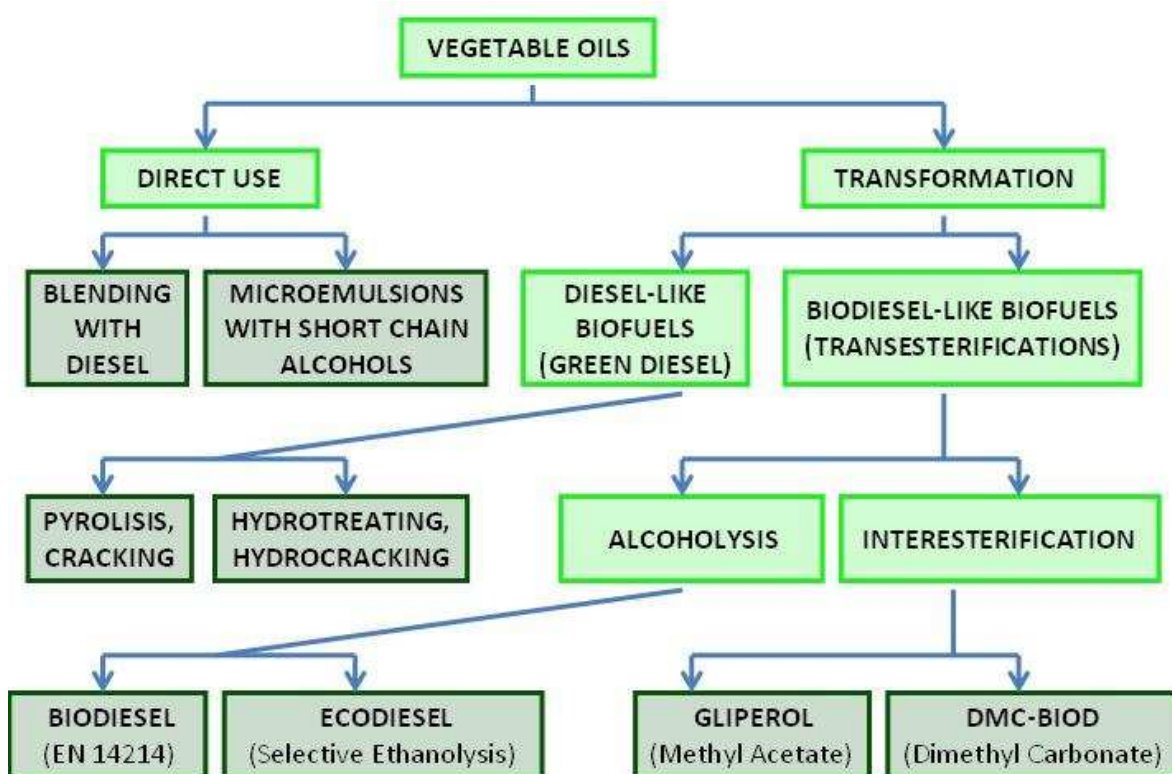


Figura 1.2. Diferentes métodos para convertir el aceite vegetal en biocombustibles [8].

La principal razón para no usar un aceite vegetal puro como combustible es su alta viscosidad, por lo que el uso directo de aceite vegetal no es aplicable a la mayoría de los motores diesel actuales. Los aceites vegetales exhiben viscosidades en el intervalo de 10 a 20 veces mayor (en el rango de 28-40 mm²/s) que el combustible diesel de origen fósil utilizado por los motores diesel convencionales (según normativa europea 2-5 mm²/s). Por lo tanto, los motores de encendido por compresión que se ejecutan con los aceites vegetales son susceptibles de verse afectados por muchos problemas, ya que están diseñados para funcionar con combustibles diesel de petróleo. Algunos de estos problemas incluyen: coquización y obstrucción de los inyectores, de tal manera que la atomización del combustible no se produce correctamente como resultado de la obstrucción de los inyectores o problemas de lubricación debido a la gelificación del aceite de lubricación como resultado de la contaminación por aceites vegetales [9].

La transesterificación de un aceite vegetal reduce de forma apreciable su viscosidad (por lo general se consiguen viscosidades de 4-5 mm²/s) cercano al del diesel de petróleo, por lo que es en la actualidad el método más común para la producción de biodiesel, debido a su simplicidad y que ha sido ampliamente estudiado e industrialmente utilizado para convertir el aceite vegetal en biodiesel [10]. Por estas razones, se espera que la cuota de biocarburantes en el mercado de combustibles de automoción crezca rápidamente en las próximas décadas. Los biocombustibles podrían ser fuentes alternativas de energía no contaminante para muchos países [11]. En este sentido, la producción de biodiesel en los últimos años se ha convertido en una potencial alternativa para atender una parte notable de la demanda de energía que se espera se produzca en el futuro en el sector del transporte [12,13].

El biodiesel se define como una mezcla ésteres etílicos o metílicos de ácidos grasos (FAEE o FAME, Fatty Acil Ethyl Ester o Fatty Acil Methyl Ester) obtenidos mediante la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales con alcoholes (por ejemplo, metanol y etanol). Así, el biodiesel es el combustible renovable y biodegradable más utilizado en la actualidad como fuente de energía alternativa para los motores diesel [14]. Como combustible, el biodiesel tiene un valor calórico comparable al diesel. Se ha demostrado que tiene una mayor eficiencia de combustión, un punto de inflamación más alto, un índice de cetano superior y que posee una mayor eficiencia lubricante. En lo que se refiere a la seguridad, el punto de inflamación más alto hace que el biodiesel sea más seguro de manejar, transportar y almacenar. La opción de la mezcla directa con diesel fósil, como combustible en los motores de encendido

por compresión (en cualquier proporción de mezcla), aporta valor al biodiesel. Los beneficios de los biocombustibles frente a los combustibles tradicionales también incluyen una mayor seguridad energética, la reducción del impacto ambiental, ahorro de divisas, y las cuestiones socioeconómicas relacionadas con el sector rural. La posibilidad de valorizar los aceites y grasas reciclados en la producción de biodiesel reduce muchas de las complicaciones relacionadas con el medio ambiente, de estos residuos.

Varios aceites vegetales comestibles tales como aceite de colza, palma, girasol y aceite de coco han sido estudiados como materia prima para la producción de biodiesel (denominados de “primera generación”). La principal desventaja en la producción de biodiesel a partir de estas materias primas es el alto precio de los aceites vegetales, usados como materia prima para la producción de los biocombustibles, en comparación con la del combustible diesel fósil. Como resultado, los aceites no comestibles tales como los aceites de cocina reciclados o residuos, son en la actualidad los más utilizados para la producción de biodiesel, debido a su bajo precio. Además, para la obtención de biodiesel de segunda generación se está investigando la utilización de algas y otras materias primas renovables que proporcionarán la sostenibilidad de todo el proceso de producción de biodiesel. Sin embargo, hay varios retos técnicos que aún hay que superar, para rentabilizar el uso de biodiesel.

Normalmente, se usa como alcohol en la transesterificación el metanol debido a sus ventajas económicas; y la reacción de transesterificación puede ser catalizada por ácidos [15,16] bases [17] y por enzimas [18]. Aunque el uso de enzimas conduce a selectividades satisfactorias, la aplicabilidad de este método es, en la actualidad, económicamente limitada por el alto precio de las enzimas, volúmenes de reacción muy grandes y elevadas velocidades de reacción. Al comparar el presupuesto del biodiesel producido mediante enzimas o químicamente, hay factores importantes a considerar, tales como el rendimiento, la flexibilidad en la materia prima, el valor de los subproductos, los costos de recuperación del alcohol, así como el costo y la duración de la enzima, además de la posibilidad de la reutilización. Los pros y los contras del uso de lipasas como biocatalizadores en comparación con los catalizadores alcalinos o ácidos para la producción de biodiesel se relacionan con los tiempos más cortos de reacción y los rendimientos obtenidos, comparados a cuando se aplica la transesterificación química.

Hay que tener en cuenta los inconvenientes producidos por los requisitos de energía, las dificultades en la recuperación del catalizador y la producción de la glicerina (subproducto que se

puede considerar como un importante factor en la contaminación del medio ambiente), son las principales desventajas de los procesos catalizados con álcali o ácido. En general, las lipasas realizan su actividad catalítica en condiciones más suaves y con una variedad de sustratos de triglicéridos, incluidos los aceites y grasas con altos niveles de ácidos grasos libres. Por otra parte, la separación y purificación de biodiesel es mucho más fácil, lo que resulta en un proceso más respetuoso del medio ambiente. Sin embargo, uno de los cuellos de botella para la aplicación industrial de las lipasas es el alto costo de los biocatalizadores. Algunos métodos de inmovilización están siendo introducidos para mejorar la estabilidad de la lipasa que permite su utilización repetida [19].

Por otro lado, el comportamiento de los catalizadores básicos homogéneos en el proceso de transesterificación depende del ácido graso libre (FFA, Free Fatty Acid) o el contenido de agua. Un contenido superior a 1,5 % en peso de ácidos grasos libres conducen a la formación de jabón y la reducción de la actividad del catalizador básico homogéneo. Una solución para superar este problema es la utilización de catalizadores ácidos homogéneos como H_2SO_4 o HNO_3 , debido a que sus actuaciones no se ven fuertemente afectadas por la presencia de ácidos grasos libres o agua y pueden catalizar simultáneamente reacciones de esterificación y transesterificación. Sin embargo, las reacciones catalizadas en medio ácido no son tan comunes como las reacciones llevadas a cabo en medio básico, porque la reacción implica tiempos de reacción más largos (hasta 96 h.) y mayor cantidad de alcohol empleado: relaciones molares con respecto al aceite (hasta 150:1 moles).

El catalizador más utilizado es el H_2SO_4 (ácido sulfúrico) y la concentración varía entre 1 y 5 % en peso. Las altas concentraciones de H_2SO_4 pueden promover la conversión adicional, dando lugar a la formación de éteres por deshidratación de alcoholes. Por lo general se recomienda una relación molar alcohol/aceite (30:1) para alcanzar una conversión de aproximadamente 98 %, y una relación molar de 6:1 para una conversión de aproximadamente 87 %. Mediante el uso de una alta temperatura de funcionamiento se puede lograr una alta conversión en menos tiempo. Por otra parte, los catalizadores ácidos son más corrosivos que los básicos que limitan sus aplicaciones industriales [20].

Una de las principales desventajas con el uso de catalizadores homogéneos es la necesidad de una etapa de neutralización y purificación de la reacción, un proceso no respetuoso con el medio ambiente, ya que produce grandes cantidades de aguas residuales. La

solución de estos problemas se puede lograr mediante el uso de catalizadores heterogéneos, que pueden ser fácilmente recuperados al final de la reacción, y también se utilizan para más ciclos de reacción (reusos) sin ningún tratamiento previo. Además, los catalizadores heterogéneos no son corrosivos. Estos catalizadores están constituidos por metales alcalino-térreos en forma de óxidos y/o carbonatos, en muy diversas mezclas de unos con otros. Entre los catalizadores heterogéneos el óxido de calcio (CaO) es el más estudiado, ya sea puro o soportado sobre diversos materiales (sílice y alúmina, etc.). Este catalizador ha demostrado ser muy recomendable debido a la posibilidad de su reutilización en la transesterificación de aceite de soja para producir biodiesel [21,22].

Por otra parte, en condiciones supercríticas -temperatura de 350 a 400 °C, presión superior a 65mPa y con una elevada cantidad de alcohol: relación molar alcohol/aceite (42:1)-, la reacción se completa en 4 min. El proceso implica operar en condiciones extremas de temperatura y presiones, lo que limita su aplicación a nivel industrial, debido a los costos de instalación y operación muy elevados, con un alto consumo de energía. Entonces, si bien los resultados de este proceso pueden ser adecuadas y en menor tiempo, la construcción de una planta industrial de esta tecnología puede ser realmente muy cara [23-26]. Debido a esto, la producción de biodiesel a nivel industrial se desarrolla actualmente mediante el uso de catalizadores básicos homogéneos, tales como NaOH o KOH y siempre se obtiene glicerina como principal subproducto.

1.2.1. Fortalezas, debilidades y obstáculos existentes para la fabricación industrial de las mezclas de FAME, que constituye en la actualidad el biodiesel convencional.

1. Producción industrial de biodiesel.

En la actualidad, la mayoría del biodiesel es producido mediante la transesterificación de triglicéridos con metanol usando un catalizador alcalino homogéneo para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y glicerina. Con el fin de cambiar el proceso de transesterificación para obtener el rendimiento más alto, el alcohol se utiliza en exceso, con respecto a las cantidades molares estequiométricas. Debido a esto, se obtienen dos fases inmiscibles, la superior en la que se encuentran los ésteres de etilo o metilo (FAEE o FAME), que es el denominado biodiesel, y una fase inferior en la que se disolvió la glicerina en el exceso de

alcohol utilizado. Además, se necesitan una serie de etapas de purificación con el fin de cumplir con las cualidades estipuladas por la normativa EN 14214, que requieren un tiempo de reacción más largo y unas condiciones muy intensas de operación [27]. Por otra parte, hay que tener en cuenta el tratamiento de las aguas residuales (ya que contienen sales), lo que aumenta los costos de funcionamiento, de modo que los gastos generales de producción del biodiesel siguen siendo superiores a la del diesel de petróleo, debido fundamentalmente al costo de la materia prima y a los costos de producción [28].

Actualmente los catalizadores básicos homogéneos se utilizan habitualmente, ya que dan lugar a velocidades de reacción adecuadas y elevados rendimientos. La reacción también se produce a temperaturas más bajas que el punto de ebullición del metanol a presión normal, reduciendo de este modo los costos de operación asociados con la producción de biodiesel. Sin embargo, los catalizadores básicos homogéneos tienen desventajas tales como la corrosión del equipo y la necesidad de eliminar los componentes inorgánicos residuales del Biodiesel generando aguas residuales [29]. Además, la presencia de ácidos grasos libres (FFA), conducen a la formación de jabón, lo que reduce el rendimiento de FAME (biodiesel). A este respecto, el proceso está lejos de ser respetuoso con el medio ambiente, ya que el producto final tiene que ser separado, neutralizando y lavando a fondo, generando una gran cantidad de residuos (por ejemplo, residuos de sales sódicas o potásicas), reduciendo al mismo tiempo la calidad de glicerina obtenida como subproducto. El catalizador homogéneo no puede ser reciclado ni reutilizado. A consecuencia de estos problemas se obtiene un aumento de los costos de producción de biodiesel [30].

Recientemente, se han investigado formas innovadoras para reducir los costes de fabricación del biodiesel. Se prefiere un proceso continuo para la producción industrial del mismo, ya que es más conveniente y económico, de modo que varios procedimientos han sido investigados para su uso en reactores continuos, tal como un reactor de flujo pistón, columna de destilación reactiva, y un reactor de microtubo, utilizando ya sea metóxido de sodio o hidróxido de sodio [31-33], así como catalizadores básicos heterogéneos [34,35]. Sin embargo, los inconvenientes más importantes siguen sin solución en la fabricación industrial de biodiesel.

A este respecto, normalmente se utiliza un exceso de metanol en este proceso con el fin de desplazar el equilibrio hacia la producción de biodiesel (FAME) y siempre se obtiene glicerina como principal subproducto a través de un proceso de 3 pasos (Figura 1.3). Esta fase contiene

glicerina, metanol sin procesar y una pequeña cantidad de otros sustratos y subproductos. La masa de glicerina en bruto es aproximadamente el 12% en peso de la masa obtenida. El contenido de glicerina puro en la fase es aproximadamente 60-70% en peso, por lo que además de las impurezas alcalinas que necesitan ser removidos en el método convencional, la glicerina es el principal inconveniente de este método, no sólo porque supone una disminución en el rendimiento atómico del proceso, sino también porque es necesario que el biodiesel obtenido no contenga glicerina residual ni impurezas alcalinas. Para conseguir esto se lava el biodiesel en varias etapas de lavado consecutivas, en los que se gasta una gran cantidad de agua, para conseguir la eliminación completa de la glicerina [36-38].

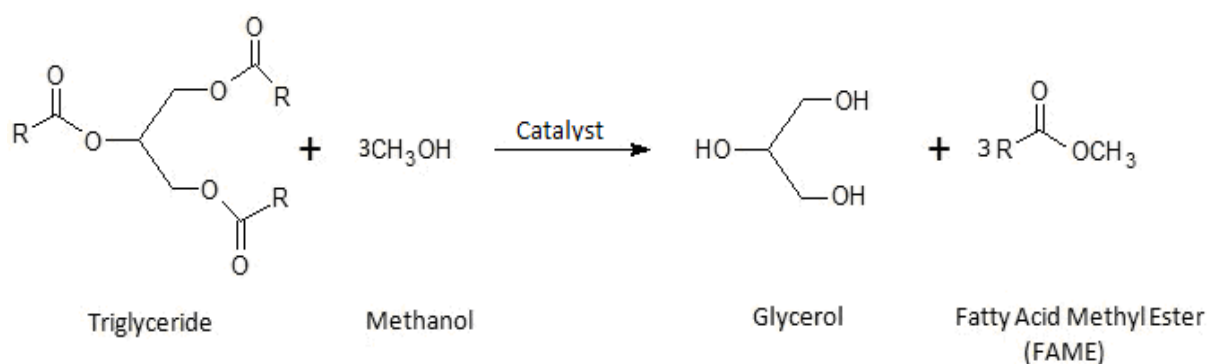


Figura 1.3. Esquema de la reacción de transesterificación de los triglicéridos con metanol (metanolisis) por catálisis básica convencional.

El diseño de una planta estándar de biodiesel que incorpora una reacción de transesterificación [8,12] se muestra en el diagrama, que se refleja en la Figura 1.4. El proceso de reacción se lleva a cabo en un reactor con agitación constante a una temperatura de 60 °C. La glicerina se separa luego por decantación y el metanol excedente se recupera por destilación. El Biodiesel contiene residuos del catalizador que deben ser neutralizados y eliminados antes de su uso. La purificación del biodiesel se lleva a cabo comúnmente mediante la neutralización y el lavado con agua caliente para eliminar todas las impurezas. Después de lavar el biodiesel, se seca en un evaporador para eliminar el agua residual que pueda contener. Otra alternativa para la purificación de biodiesel es el uso de resinas que absorben las impurezas. Este proceso consta de una columna rellena con resina en la que se hace circular un flujo de biodiesel, que sale de la parte inferior de la columna libre de contaminantes. Dependiendo del nivel de contaminación del biodiesel y el tipo de resina, tiene una duración diferente. Las resinas pueden pasar por un proceso de lavado para ser utilizado de nuevo.

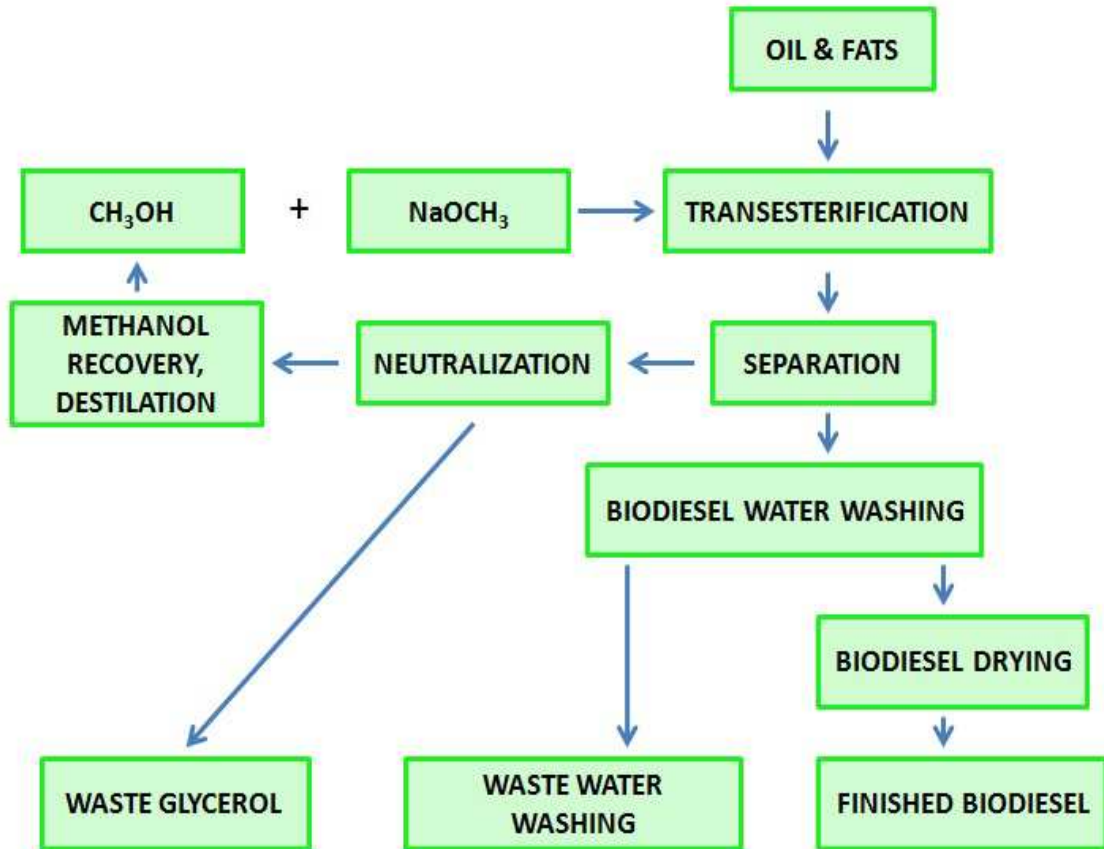


Figura 1.4. Proceso de producción de biodiesel utilizado actualmente [8].

Independientemente del procedimiento para obtener el denominado biodiesel convencional (obtenido de acuerdo con la normativa EN 14214), en todos los casos la glicerina se recoge como subproducto, lo que representa una notable pérdida de rendimiento del proceso, y además el mercado está ya prácticamente inundado de glicerina por su elevada producción [39-41], situación que se agrava en los últimos años, por el continuo aumento en la producción de biodiesel. También, es necesaria la eliminación de la glicerina, debido a su capacidad de reacción con el oxígeno en el interior del motor a alta temperatura, donde se puede producir deshidratación hacia acroleína, que al polimerizar causa varios problemas, incluyendo el coque del combustible (Figura 1.5). Este coque también puede generar depósitos de compuestos carbonosos en los inyectores, pistones y válvulas en los motores, reduciendo así su eficiencia e incluso su vida de servicio [42-45].

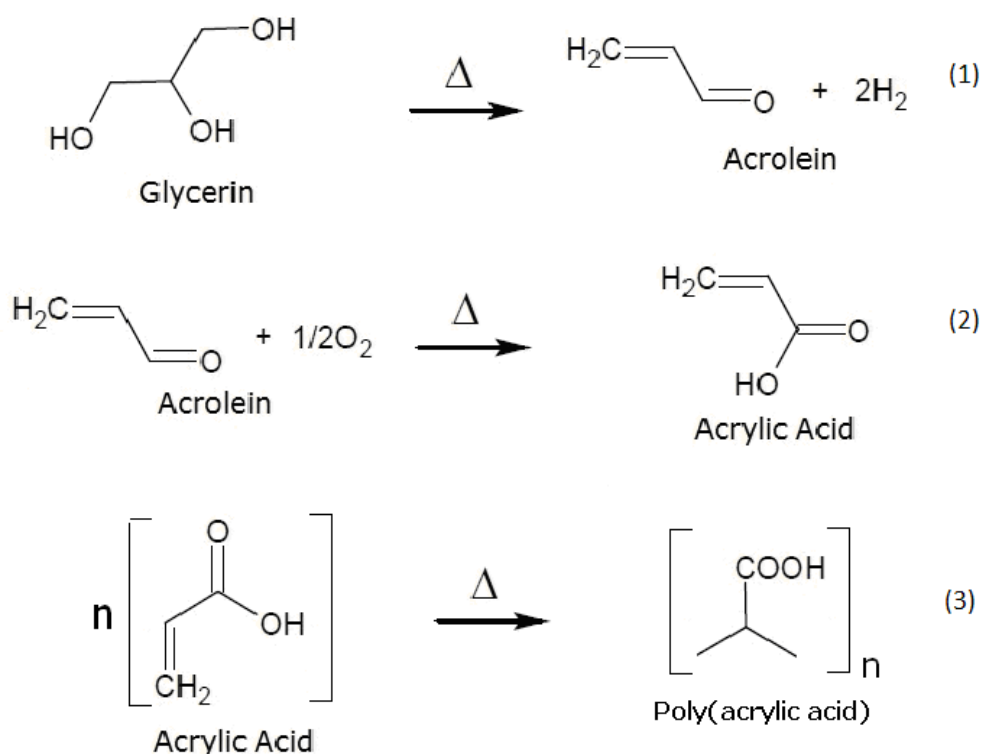


Figura 1.5. Los procesos de deshidratación (1), oxidación (2) y polimerización (3) que se desarrollan a altas temperaturas dentro de los motores por la glicerina residual en el biodiesel.

2. *Tecnológicas alternativas consideradas actualmente para resolver el problema de los excedentes de glicerina obtenidos en la producción de biodiesel.*

Con independencia del elevado coste de producción asociado a la limpieza de la glicerina, la desventaja más importante para la sustitución de una parte de los combustibles fósiles por el biodiesel es la cantidad de glicerina residual que se podría llegar a producir. Esta cantidad podría estimarse alrededor de 160.000 toneladas/día en todo el mundo, para la sustitución de sólo un moderado 10% en peso de los 90 millones de barriles de petróleo y combustibles líquidos actualmente consumida por día, de modo que el exceso de glicerina generada podría convertirse en un problema medioambiental [46]. Esto resultará en una disminución adicional en la rentabilidad de la producción de biodiesel a menos que se encuentren nuevos usos para la glicerina “residual”. Además, al producirse glicerina en la reacción de transesterificación se está perdiendo rendimiento de producción de biodiesel. Este superávit de glicerina actualmente existente también indica que los procesos en los que se utilizan la glicerina materia prima presentan muchos inconvenientes y que su eficiencia y rentabilidad son todavía demasiado bajas [47].

El método actual de gestión más simple (y habitual) de la glicerina en bruto es su combustión, su principal ventaja es que no requiere ninguna purificación, lo que incrementaría el coste del método. Sin embargo, este proceso no es fácil desde el punto de vista tecnológico. Además, el calor de combustión es dos veces menor que el de los combustibles fósiles, pero es comparable con el calor de combustión de la mayoría de los tipos de biomasa (por ejemplo, madera o paja). El poder calorífico es menor debido a la cantidad relativamente grande de agua que se obtiene. Por otra parte, el agua hace que la combustión de la glicerina sea muy difícil debido a que conduce a la inhibición de la llama en los quemadores y la formación de grandes cantidades de coque. En la práctica, es necesario llevar a cabo una co-combustión de glicerina con otros combustibles líquidos utilizando quemadores especiales, por lo que la co-combustión de la glicerina/biomasa aún no se ha llevado a cabo a gran escala [47].

Actualmente, gran parte del trabajo científico en curso consiste en desarrollar procesos innovadores para tratar la glicerina obtenida en la síntesis de biodiesel. Los numerosos métodos que utilizan glicerina residual se pueden clasificar de acuerdo a los productos obtenidos o la tecnología aplicada [48]. Así, mediante su transformación química, la biotecnología o la oxidación catalítica selectiva, se investiga la utilización de la glicerina para lograr productos de química fina de alto valor añadido, tales como monómeros para la producción de polímeros de alto consumo, como la acroleína [49]; alcoholes, principalmente el 1,2-propanodiol [50]; el 1,3-dicloro-2-propanol [51] o la epiclorhidrina [52] obtenida por cloración; éteres de terc-butanol, utilizados como aditivos para combustibles y obtenidos por eterificación [53]; monoacilglicerol y diacilglicerol obtenidos por esterificación [54]; y también el 1,2-propanodiol y el 1,3-propanodiol obtenidos por reducción [55].

Un gran número de productos se puede obtener por oxidación selectiva del glicerol en la fase gaseosa o líquida, y en presencia de diferentes catalizadores [56-58]. También se ha estudiado la pirólisis y la gasificación de la glicerina a 650-800 °C bajo presión atmosférica para la generación de hidrógeno [59], así como el reformado para obtener hidrógeno y/o monóxido de carbono e hidrocarburos. Dependiendo de la fuente de calor y los reactivos, el proceso puede ser operado como un reformado con vapor en la fase de gas (con o sin catalizadores) o en la fase acuosa y como un proceso autotérmico en la fase acuosa [60-62]. Se ha descrito la conversión fotocatalítica de glicerol en hidrógeno en presencia de varios catalizadores soportados de metal [63]. Se ha estudiado la bioconversión de glicerol (y residuos orgánicos) en hidrógeno [64]. También se ha investigado la conversión de glicerina en otras sustancias químicas útiles como el

β -caroteno [65] o como una fuente de carbono orgánico en el proceso de fermentación por microorganismos [66,67].

En resumen, parece que al menos algunas de las tecnologías señaladas conducen a la fabricación de productos tradicionales que actualmente se obtienen por otras tecnologías, pero en realidad las tecnologías basadas en el uso de la glicerina como materia prima, da como resultado una menor rentabilidad en la producción de dichos productos convencionales. Por lo tanto, todavía es muy difícil de considerar una manera realista para la conversión de la glicerina en productos útiles, capaces de compensar el sobrecoste de la limpieza del biodiesel, obtenidos por el procedimiento de transesterificación convencional [68-70].

Entonces, para garantizar un proceso para la sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles es necesario garantizar no sólo que exista suficiente materia prima de aceite y un método eficaz para la producción de biocombustibles, sino también es obligatorio reutilizar de manera rentable todos los subproductos generados durante el proceso, como pueden ser las tortas de semillas oleaginosas, obtenidas en la extracción del aceite o la glicerina. En resumen, el proceso tiene que ser rentable en cada una de las tres etapas del proceso, no sólo en la obtención de los mejores materias primas por el cultivo de la semilla más adecuada y la obtención del correspondiente aceite vegetal, (comestible o no comestible, es decir, de colza, girasol, soja o jatrofa), y en el proceso de transesterificación incluyendo también la correcta gestión económica y ambiental de los desechos y subproductos.

Actualmente existe un debate en relación con el uso de aceites comestibles para producir biodiesel, debido a la brecha entre la oferta y la demanda de este tipo de aceites en muchos países (lo que podría limitar su capacidad de expansión). Con independencia de este debate, los dos primeros puntos ya están resueltos, pero aún queda la cuestión del excedente mundial de glicerina y su generación con el proceso de transesterificación convencional.

A este respecto, las grandes cantidades de glicerina existentes han dado lugar a una caída dramática del precio de la glicerina en el mercado, ya que los productos tradicionales obtenidos a partir de la glicerina tienen una demanda limitada. Hoy en día, sólo hay un número limitado de publicaciones y de patentes sobre los nuevos métodos de conversión de glicerol en productos útiles y rentables, y las investigaciones de tecnologías innovadoras se encuentran en la mayoría de los casos en la fase preliminar de la investigación. Por lo tanto, la producción de biodiesel

está ralentizada porque se necesitan nuevos métodos para la utilización de la glicerina que sean industrialmente viables y además rentables. Estos métodos deben permitir la producción de mayores cantidades de productos químicos derivados del glicerol [47].

1.2.2. Biocombustibles obtenidos por hidro-procesamiento de aceites y grasas en las plantas de refino de petróleo actuales: Green Diesel.

Teniendo en cuenta las desventajas del biodiesel citadas anteriormente, varios procedimientos alternativos están desarrollándose para la conversión de grasas y aceites en biocombustibles de calidad para su aplicación en motores diesel. Así, numerosos procesos (craqueo o pirólisis, hidrodeshidrogenación o de hidrocraqueo) se pueden utilizar para la obtención de combustibles similares al diesel de petróleo. A este respecto, el hidrotreatmento catalítico de aceites vegetales, proceso realizado en refinerías, es una de las mejores soluciones alternativas posibles [71]. Este biocombustible ha ido ganando importancia en los últimos años y se conoce como "Green Diesel", un combustible diesel de carácter renovable cuya composición se asemeja a la del combustible diesel derivado del petróleo.

En consecuencia, las materias primas de carácter renovable se pueden convertir en hidrocarburos, similares a los presentes en los combustibles fósiles y evitando la presencia de glicerina, por un procedimiento de hidrocraqueo. De hecho, la producción de hidrocarburos, aplicados como biocombustibles, a partir de aceites vegetales mediante un proceso de craqueo o "cracking", en realidad precede a la primera cita de la expresión biodiesel. Este procedimiento de "cracking" en general, produjo una variedad de productos, incluyendo la gasolina y el diesel de petróleo como combustibles, en las que se realizó la descomposición de los aceites a altas temperaturas en presencia de hidrógeno de modo que varios documentos se refieren indistintamente a los términos de craqueo e hidrocraqueo [71]. Los trabajos pioneros de "cracking" de diversos aceites vegetales se llevaron a cabo en China en la década de 1930, donde se utilizaron estos combustibles como sustitutos de emergencia para los combustibles derivados del petróleo durante la Segunda Guerra Mundial [72].

Desde entonces, se han descrito muchos catalizadores y diferentes procesos para transformar diversos aceites vegetales en alcanos normales, en el intervalo de ebullición de la gasolina o el diesel, mediante el empleo de un proceso de hidrotreatmento. En la última década, cuando comenzó la preocupación con respecto a los recursos energéticos y el medio ambiente,

aumentó el interés en el estudio de fuentes de energía alternativas para proporcionar un sustituto del petróleo diesel adecuado para los motores de combustión interna [73-91]. En la actualidad, los resultados más prometedores se han obtenido mediante el hidrotratamiento conjunto de hidrocarburos procedentes del petróleo, junto con cantidades equivalente de aceites y/o grasas, en las instalaciones disponibles en las actuales refinerías, aplicadas a la desulfuración de los hidrocarburos procedentes del petróleo [93-103]. Para ello también se aplican los mismos catalizadores desarrollados para la desulfuración de los combustibles fósiles.

Así, mediante un proceso de reformado de mezclas de aceite de colza y un gasóleo procedente de la destilación directa del crudo (con un contenido de azufre del 0,95%) con un catalizador bimetalico de NiMo, soportado en P/ Al₂O₃, se obtiene no sólo la eliminación del azufre y del nitrógeno del gasóleo, sino que además se lleva a cabo la eliminación del oxígeno de los triglicéridos, mediante un proceso complejo en el que intervienen diversas reacciones de hidrogenación, decarboxilación y descarbonilación y en forma moderada la hidrogenación de aromáticos. Las condiciones de operación óptimas, en un reactor de flujo, tienen lugar a temperaturas en el intervalo 350-360 °C; 60 bar; LHSV: 1,5h⁻¹; relación H₂/hidrocarburos: 600 Nm³/m³. Operando en estas condiciones se obtienen fracciones de hidrocarburos útiles como combustibles con contenidos de azufre y óxidos de nitrógeno ≤ 10 mg/kg, muy por debajo de lo exigido y con números de cetanos significativamente superiores (60-80) que los exigidos (mínimo 51) por los estándares, EN 590, [103].

Tenemos por tanto que, es posible obtener alcanos líquidos de carácter renovables por tratamiento de mezclas de aceites vegetales y gasóleo pesado de vacío (HVO), en corriente de hidrógeno y catalizadores convencionales actualmente empleados en las unidades de hidrocrackeo de las plantas petroquímicas, como pueden ser el catalizador de sulfuros bimetalicos NiMo/Al₂O₃ y muchos otros convencionales, operando en diferentes condiciones de presión y temperaturas en el intervalo 300-450 °C.

La reacción descrita implica la hidrogenólisis de los enlaces C-C de los aceites vegetales, lo que conduce a una mezcla de alcanos de bajo peso molecular, por tres rutas diferentes: descarbonilación, descarboxilación e hidroxigenación, promovidas por catalizadores comerciales de hidrotratamiento del tipo NiMo presulfurados, soportados [79], que pueden ser empleados en una planta piloto con reactor de hidrotratamiento de lecho fijo (esquema en Figura 1.6), operando en el intervalo 330-390 °C, a 3 MPa y velocidad espacial 2 h⁻¹. Como

subproductos se obtienen gases constituidos por H_2 , CO , CO_2 , O_2 , N_2 , H_2S , CH_4 e hidrocarburos C_2-C_6 y un significativamente elevado rendimiento, del orden del 80% en peso, de hidrocarburos líquidos. Estos hidrocarburos líquidos obtenidos tienen un bajo índice de acidez, densidad y viscosidad adecuadas, y un elevado índice de cetano. En este sentido, los catalizadores de hidrodesulfuración tradicionales, constituidos por sistemas bimetálicos sulfurados soportados del tipo $NiMo/Al_2O_3$, $CoMo/Al_2O_3$, y NiW/Al_2O_3 están siendo investigados en la actualidad para obtener diesel renovable en las instalaciones de las refinerías de petróleo convencionales.

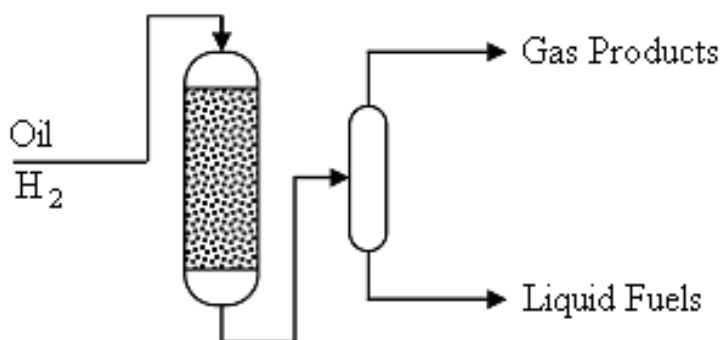


Figura 1.6. Producción de biodiesel de alta calidad a partir de aceites vegetales por hidrotratamiento junto con hidrocarburos de petróleo en un reactor de lecho fijo, mediante el uso de un catalizador de hidrotratamiento comercial presulfuro de tipo $NiMo$ presulfurado, operado a $350\text{ }^\circ\text{C}$.

En general, el proceso transcurre mediante una hidrogenación simple o hidrodesoxigenación (HDO), a través de un enol intermedio, que produce agua, propano y tres alcanos normales con la longitud correspondiente a las cadenas de los ácidos grasos que forman el aceite. Mediante esta reacción, un mol de triglicérido reaccionaría con 16 moles de hidrógeno (suponiendo cuatro dobles enlaces/mol), formando seis moles de agua, un mol de propano y tres moles de una mezcla de hidrocarburos $n-C_{18}$ y $n-C_{22}$. También se produce un proceso de descarboxilación o eliminación de CO_2 , en el que el triglicérido se divide en propano, dióxido de carbono y/o monóxido de carbono y en un n -alcano con un átomo de C menos que el correspondiente a la longitud de los ácidos grasos. Para el aceite de colza, los n -alcanos obtenidos se encuentran en el intervalo $n-C_{17}$ y $n-C_{21}$ [92].

En resumen, las unidades de hidrotratamiento de los diesel fósiles existentes en las refinerías, estaban inicialmente destinadas a reducir el contenido de azufre de los combustibles, para cumplir con las normativas específicas de los diferentes países. Sin embargo, este proceso se ha convertido actualmente en una de las mejores tecnologías disponibles para la producción de biocombustibles diesel de alta calidad en las refinerías de petróleo convencionales, mediante el tratamiento de aceites vegetales o grasas animales con hidrógeno a presiones variables, en presencia de los mismos catalizadores metálicos soportados empleados en la desulfuración de los combustibles diesel de origen fósil. Estos combustibles diesel de alta calidad, se suelen denominar a menudo como diesel renovable o diesel verde, que contiene los mismos componentes que los presentes en el diesel fósil [102-109].

Esta metodología es especialmente útil para ser aplicada con aceites con un elevado contenido en ácidos grasos (aceites usados no comestibles), ya que conducen a la formación de jabones, lo que conlleva pérdida de aceite y problemas de separación del producto durante la transesterificación convencional. Además, otra ventaja de los biocombustibles obtenidos mediante el hidrotratamiento de aceites vegetales respecto a la utilización de biodiesel, está relacionado con el hecho de que en el primer caso se obtienen los mismos componentes que los presentes en el diesel fósil, de modo que la obstrucción del filtro y las propiedades de flujo en frío mejoran respecto al biodiesel convencional. Sin embargo, hay una disminución en el rendimiento atómico del proceso (eficiencia atómica), porque se produce una pérdida significativa de materia prima ya que el oxígeno presente en el triglicérido se elimina en forma de CO_2 y H_2O [92]. En la práctica, se obtiene una pérdida completa de la glicerina (como en la producción de biodiesel), pero de esta manera se evitan las operaciones de limpieza de los biocombustibles, aunque también tiene menos lubricidad que el biodiesel.

Por otra parte, las ventajas del hidrotratamiento, respecto al biodiesel convencional obtenido por transesterificación con metanol son la reducción del coste del tratamiento, la compatibilidad con la infraestructura ya disponible en las actuales refinerías de petróleo, la reducción de emisiones de NO_x y la flexibilidad de la materia prima aplicable en este proceso. Por lo tanto, el uso de HVO permite disminuciones de NO_x , PM, HC y CO sin efectuar cambios en los motores. El HVO podría desempeñar un papel importante en el suministro de una fuente sostenible de combustibles para el transporte en las próximas décadas [110]. Hasta qué punto este biocombustible será viable en el futuro o no, desde un punto de vista económico, frente a los combustibles derivados del petróleo, u otros biocombustibles avanzados no está claro en

este momento, pero un reciente estudio de la cadena de valor de estos biocombustibles ha destacado varios factores que tendrán un impacto importante en las economías a gran escala [111]. Estos factores incluyen la capacidad de procesamiento en las refinerías existentes y las ventajas de usar la logística existente, especialmente durante las primeras producciones comerciales.

La capacidad para financiar el desarrollo del proceso oportuno y la actualización comercial correspondiente con sus riesgos asociados también debe tenerse en cuenta. De hecho, la mayoría de las instalaciones necesarias podría ser capaz de operar a una escala comparable a la utilizada actualmente en la industria de los combustibles a base de petróleo, con ahorros de costes sustanciales.

En resumen, la aplicación del método de co-procesamiento de aceites y grasas de cualquier calidad, junto con el diesel fósil en instalaciones de hidrocraqueo ya existentes, tiene notables ventajas sobre los métodos convencionales de producción de biodiesel, ya que aún no han sido factibles los procedimientos desarrollados para explotar la glicerina residual, producida en el proceso de transesterificación.

1.2.3. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de diversos derivados del glicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.

Para evitar los problemas asociados con la generación de glicerina en el proceso convencional, se consideran una serie de métodos alternativos para conseguir la mayor eficiencia atómica evitando también la presencia de glicerina. En este sentido, la transformación de la glicerina residual en compuestos que contienen oxígenos ramificados, útiles como aditivos para los combustibles diesel, se está considerando en la actualidad como una solución interesante para dar salida a los crecientes stocks de glicerina generada en la producción de biodiesel [46-112]. Así, varios compuestos oxigenados, obtenidos por transformación de glicerol a través de reacciones de eterificación, esterificación y acetalización, han sido evaluados como aditivos o componentes adicionales para la formulación de biodiesel. La adición de estos compuestos no sólo ha mejorado las propiedades a baja temperatura del biodiesel (es decir, el punto de obstrucción del filtro en frío) y la viscosidad, sino que además no altera otros parámetros importantes en la calidad del biodiesel. Aunque la mayoría de los derivados

oxigenados estudiados ni mejoran significativamente la calidad del biodiesel, ni ejercen significativamente ningún efecto negativo.

Junto con esta estrategia, que consiste en la obtención de derivados oxigenados adecuados de la glicerina, después de su separación en la reacción de transesterificación, existe otro objetivo de gran interés en la actualidad que es la producción en una sola reacción, de nuevos biocombustibles que integran la glicerina como un producto derivado, miscible con los ácidos grasos de los ésteres de metilo o etilo (FAME o FAEE) obtenidos en un proceso de transesterificación único. Básicamente, esto es posible mediante el uso de algunos ésteres alternativos, en lugar del alcohol generalmente empleado en el proceso convencional. Por lo tanto, si algún compuesto derivado del glicerol se obtiene al mismo tiempo que el FAME (o FAEE) en un proceso de interesterificación, se obtiene un nuevo biocombustible en una sola reacción evitando la presencia de glicerina. Por lo que con esta metodología se evita la separación de glicerina antes de su transformación, lo que simplifica el proceso [46-112]. Estos biocombustibles no sólo impiden la generación de residuos, sino también aumentan los rendimientos del proceso, siempre mayor que el 12% en peso, mediante la incorporación de algunos derivados del glicerol en los productos de reacción, así como todos los reactivos utilizados. De esta manera, se obtiene una mayor eficiencia atómica, prácticamente el 100% en peso. Actualmente se están desarrollando metodologías novedosas para preparar ésteres de lípidos utilizando diferentes aceptores de acilo que ofrezcan directamente co-productos alternativos [113-115].

Los procesos de interesterificación se pueden realizar con los mismos catalizadores utilizados en los procesos de transesterificación (con catalizadores homogéneos o heterogéneos, ácido o básico, lipasas, en condiciones supercríticas, etc.), aunque en la actualidad la mayor parte de estos procesos, cuando se aplica a la producción de biocombustibles, se llevan a cabo usando diferentes lipasas [113], donde en lugar de utilizar metanol, la síntesis está catalizada por lipasas de ésteres de alquilo de ácidos grasos. También se puede realizar utilizando los donantes alternativos de alcohol tales como acetato de metilo o etilo (alquilo) y carbonato de dimetilo o de dietilo. Estas mezclas incluyen moléculas de derivados de glicerol tienen propiedades físicas relevantes para ser empleadas como nuevos biocombustibles. La eficiencia atómica se mejora con el número total de átomos que participan en la reacción. Incluso los reactivos utilizados se mantienen junto a los productos de reacción pudiendo ser utilizados directamente como biocombustibles.

1.2.4. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de triacetato de glicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.

Las mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y triacetato de glicerol (triacetina) son productos de la reacción de interesterificación de triglicéridos con acetato de metilo en presencia de catalizadores ácidos fuertes, por lo que todos estos productos podrían ser utilizados como componentes de un nuevo tipo de patentes sobre biocombustibles, que mejora fuertemente la economía de la producción de biocombustibles (Figura 1.7). Esta mezcla denominada Gliperol se describe con características comparables a las del biodiesel tradicional [116-118]. Este biocombustible se compone de una mezcla de tres moléculas de FAME y una molécula de triacetina, obtenidos después de la interesterificación de un mol de TG con tres moles de acetato de metilo, utilizando un catalizador ácido, una relación molar aceite/acetato de metilo (1/3-1/9), y un rango de temperaturas de 40-200 °C.

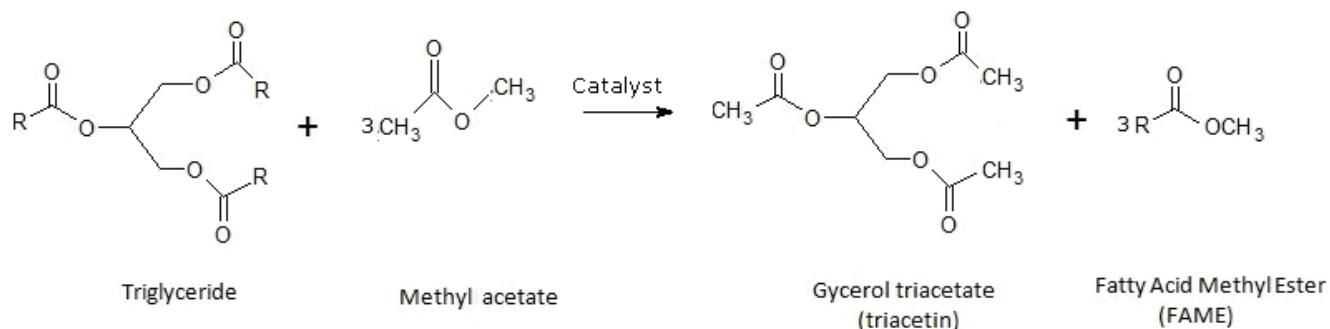


Figura 1.7. Gliperol® es un nuevo biocombustible desarrollado por el Instituto de Investigación de Química Industrial Varsow (Polonia) [116], formado por una mezcla de tres moles de FAME y un mol de triacetina, y se obtiene mediante interesterificación de triglicéridos con acetato de metilo en condiciones fuertemente ácidas.

La mayoría de los estudios al respecto se han realizado con lipasas aplicadas como biocatalizadores, con sistemas libres de disolvente [119-128] o en líquidos iónicos [129], en condiciones supercríticas [130-135], en una interesterificación asistida con ultrasonidos [136] o con catalizadores homogéneos como el KOH [137-140]. Así, se ha evaluado la posibilidad de obtener Gliperol en condiciones básicas convencionales, evaluando los parámetros cinéticos críticos para obtener la interesterificación química del aceite de girasol con acetato de metilo, con

hidróxido de potasio, metóxido de potasio y glicolato de polietileno como catalizadores [137-139]. Los experimentos de interesterificación química se realizaron en el intervalo de temperaturas comprendidas entre 30-50 °C y con relaciones molares de catalizador a aceite de 0,1/1; 0,15/1 y 0,2/1, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de diacetina y monoacetina, junto a la triacetina. Cuando se utilizó metóxido de potasio como catalizador en estas condiciones, se alcanzó el equilibrio en los primeros 15 min de la reacción. Las proporciones de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y triacetina en el producto de reacción fueron 76,7 % y 17,2 %, respectivamente. A pesar del carácter más “respetuoso” del acetato de etilo, este aceptor de acilo está siendo menos estudiado que el acetato de metilo [113,141-143], aunque los resultados descritos indican un comportamiento similar al acetato de metilo en la interesterificación con lipasas. Sin embargo, en este caso se obtienen FAEEs (en lugar de FAMEs).

Respecto a la influencia de la triacetina en el rendimiento del motor, hay un elevado número de estudios que considera a esta molécula como una buena solución frente a la glicerina producida en la síntesis convencional de biodiesel [40,112,144-150]. Se obtiene que la triacetina actúa como un aditivo antidetonante cuando se utiliza junto con el biodiesel, en motores diesel convencionales. El uso de la triacetina como aditivo mejora el rendimiento del motor y reduce las emisiones. Entre todas las mezclas de combustibles estudiados, la combinación 10% en peso de triacetina con biodiesel muestra los mejores resultados [151-153]. Se puede concluir que la interesterificación de triglicéridos con acetato de etilo o metilo puede ser una metodología muy adecuada para obtener, en un solo paso, biodiesel convencional (FAME o FAEE) junto con una cierta cantidad de un buen aditivo como es triacetina.

1.2.5. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de ésteres de carbonato de glicerol de ácidos grasos en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.

El carbonato de dimetilo (DMC) se puede utilizar como un reactivo en la reacción de transesterificación, para la obtención de ésteres a partir de lípidos, generando directamente co-productos de la glicerina solubles en el biodiesel. La reacción es bastante atractiva, ya que el DMC se considera un prototipo de reactivo “respetuosos” con el medio ambiente. Es de destacar que las materias primas para la producción de DMC, es decir, metanol y monóxido de carbono, se pueden obtener a partir del gas de síntesis, que se pueden producir a partir de la conversión termoquímica de la biomasa [154]. Por lo tanto, un combustible sintetizado usando DMC y aceites vegetales o grasas animales como materias primas debe ser considerado como un combustible alternativo totalmente producido con recursos renovables. Por lo tanto, el carbonato de dimetilo funciona como un aceptor de acilo, que es neutro, barato, y no tóxico. El proceso de síntesis de biodiesel es irreversible debido a que el compuesto intermedio (éster monoacílico del ácido carbónico) se descompone inmediatamente en dióxido de carbono y un alcohol [113].

La reacción entre triglicéridos y DMC produce una mezcla de FAMEs y ácidos grasos de carbonato de glicerol (FAGCs), lo que constituye un nuevo tipo de biodiesel denominado DMC-BIOD [155] en la patente correspondiente [156]. La reacción de interesterificación de triglicéridos con carbonato de dimetilo (DMC), puede generar una mezcla de FAME, moléculas FAGC y también de carbonato de glicerol (GC) como se indica en la Figura 1.8. En la práctica se utilizan, varios catalizadores básicos como NaOH o KOH, metóxido de sodio, hidruro de sodio y algunas aminas [155-160]. Se utiliza el nombre de carbonato de glicerol para denominar el 4-hidroximetil-2-oxo-1,3-dioxolano, y el dicarbonato de glicerol para el 4-metoxicarboniloximetilo-1,3-dioxolan-2-ona, que también se obtiene en el proceso de interesterificación. Estas mezclas, incluyendo moléculas derivadas del glicerol tienen propiedades físicas apropiadas para ser empleadas como un nuevo biocombustible patentado [154], donde también se mejora la eficiencia atómica.

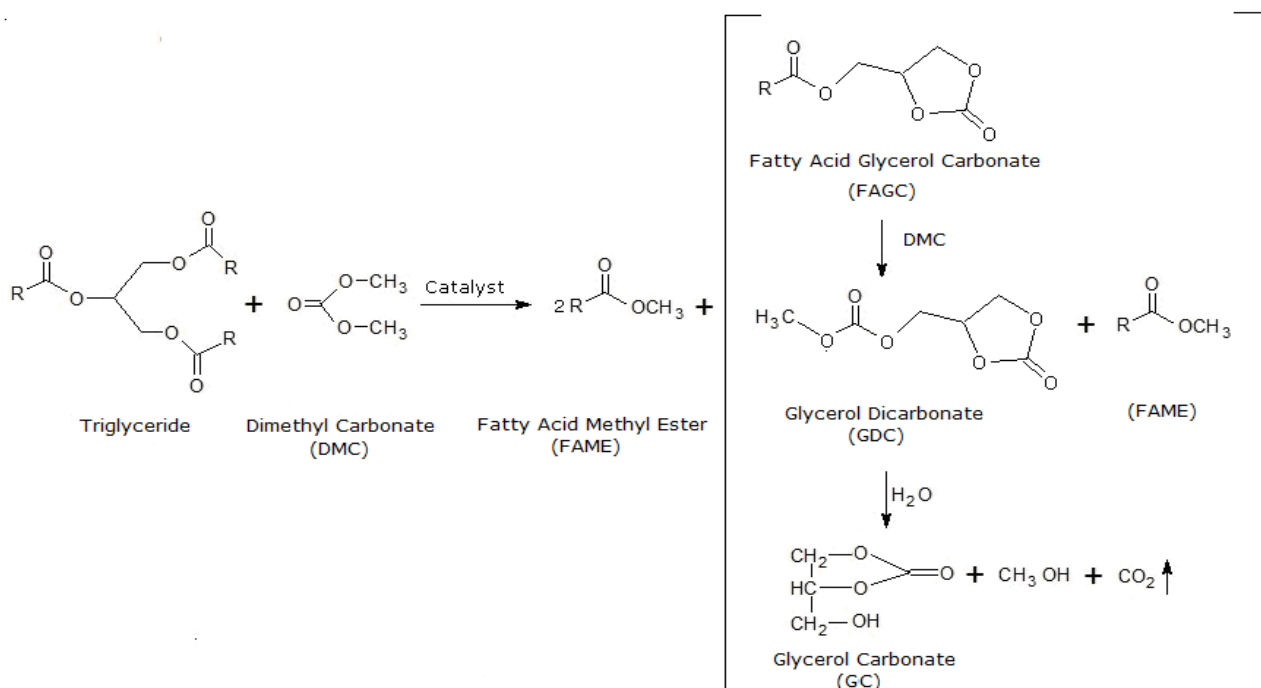


Figura 1.8. DMC-bioD® es un nuevo biocombustible patentado por Polimeri Europa (Italia) [156], obtenido por la reacción de aceites con carbonato de dimetilo (DMC) en condiciones alcalinas, lo que evita la generación de glicerina mediante la obtención de una mezcla de dos moles de FAME y un mol de ácido graso de glicerol carbonato (FAGC). Este último puede ser descompuesto generando de esta manera glicerol dicarbonato (GDC) y carbonato de glicerol (GC) en una extensión variable.

En los últimos años se han realizado diversos estudios para mejorar este proceso en el que el DMC se utiliza como reactivo en la reacción de transesterificación, usando diferentes catalizadores [155-160], condiciones supercríticas [161-165] o lipasas [166-174], ya que el DMC tiene fama de ser un prototipo de reactivos “respetuosos” con el medio ambiente [154] con el que se evita la co-producción de glicerina. La principal diferencia entre el DMC-BIOD y el biodiesel producido a partir de aceite vegetal y metanol es la presencia de FAGCs además de FAME. La influencia de la composición de DMC-BIOD, en las propiedades físicas y reológica significativas para su uso como un biocombustible han sido evaluadas [175]. La presencia de FAGCs influye tanto en el comportamiento como combustible, como en las propiedades de flujo (viscosidad), mientras que la distribución de los principales compuestos pirógenos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), se ve poco afectado.

En resumen, respecto a los beneficios y los inconvenientes del DMC como un reactivo alternativo para llevar a cabo la interesterificación de aceites y grasas para producir biocombustibles a partir de recursos renovables, se debe mencionar que el DMC es un reactivo menos tóxico que el MeOH, y que puede ser fabricado actualmente mediante métodos industriales ambientalmente seguros, a partir de recursos renovables y CO₂.

Por otra parte, se obtienen importantes conversiones de triglicéridos mediante el uso de diferentes catalizadores básicos, lipasas, etc., que operan bajo condiciones relativamente suaves. Además, el carbonato de glicerol y sus derivados se caracterizan por su baja toxicidad y el posible resto de DMC que no haya reaccionado no necesita ser separado de los productos de reacción, debido a que es un aditivo eficaz para motores diesel, debido a su alto contenido de oxígeno [176]. Así que tenemos un proceso de fabricación simple respecto a la obtención de biodiesel convencional a partir de metanol.

Es destacable que mientras que en el proceso de metanolisis todo el glicerol se convierte en subproducto, en la reacción de obtención del DMC una gran fracción de glicerol (puede ser > 65%) se incorpora en el biocombustible en forma de FAGCs y sólo una fracción menor se convierte en carbonato de glicerol y dicarbonato de glicerol [154]. Por lo tanto, esta opción es más rentable que el método de dos pasos en los que el subproducto (glicerina) obtenido en el proceso de transesterificación convencional se transforma, en un segundo paso, en carbonato de glicerol y dicarbonato de glicerol [177-180]. Estos últimos compuestos obtenidos de esta manera pueden encontrar una mejor utilización como aditivo o como productos químicos intermedios y su introducción en el mercado puede contribuir a mitigar el problema de la sobreproducción de glicerina debido a la creciente utilización de biodiesel convencional.

Por último, se puede concluir que la presencia de FAGCs en el biocombustible DMC-BIOD tiene algunos efectos perjudiciales sobre las propiedades de flujo (valores de viscosidad) con respecto al biodiesel convencional (FAME puro), de modo que su uso como B100 puro en la actualidad no es aconsejable. Sin embargo, el uso de DMC-BIOD como aditivo para diesel fósil (por ejemplo, en el típico B20, relación 20/80 de biocombustible/diesel) parece ser muy adecuado para los motores diesel existentes. Los resultados obtenidos a partir de experimentos de pirólisis apoyan la opinión de que el biodiesel es intrínsecamente menos propenso a emitir HAP (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) que el petróleo diesel. La presencia de los

componentes más oxigenados (FAGCs) en el DMC-BIOD no afecta sustancialmente a los niveles de emisión de HAP.

1.2.6. Biocombustibles del tipo del biodiesel producidos mediante la obtención de monoacilglicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.

Recientemente se ha desarrollado un protocolo para la preparación de un nuevo tipo de biodiesel que integra el glicerol en su composición a través de transesterificación enzimática 1,3-regioselectiva de aceite de girasol usando lipasa pancreática de cerdo (PPL, Pig Pancreatic Lipase) en forma libre [181-183] y/o inmovilizada [184-186]. Se encontró que las condiciones de funcionamiento, en comparación con el método de preparación del biodiesel convencional, eran mucho más suaves y sin generación de residuos en las condiciones del proceso de reacción. Por lo tanto, el ya patentado Ecodiesel-100 [181-186] obtenido a través de la etanolisis parcial 1,3-selectiva de los triglicéridos con PPL, es una mezcla de dos partes de FAEE y una parte de la MG (monoglicérido), que integra la glicerina como MG en el combustible diesel, pero a diferencia de estos métodos, siendo más económica la reacción, ya que el etanol es más barato que los reactivos específicos (tales como el carbonato de dimetilo o el acetato de metilo). El procedimiento se aprovecha de la naturaleza 1,3-selectiva de las lipasas, lo que permite “detener” el proceso en el segundo paso de la alcoholisis, obteniendo de este modo una mezcla de dos moles de FAEE y uno de MG (Figura 1.9). Esta estrategia se basa en la obtención de una alcoholisis parcial por la aplicación de las lipasas 1,3-selectivos, por lo que el glicerol se mantiene en forma de monoglicérido que evita la producción de glicerina como subproducto, lo que reduce el impacto medioambiental del proceso.

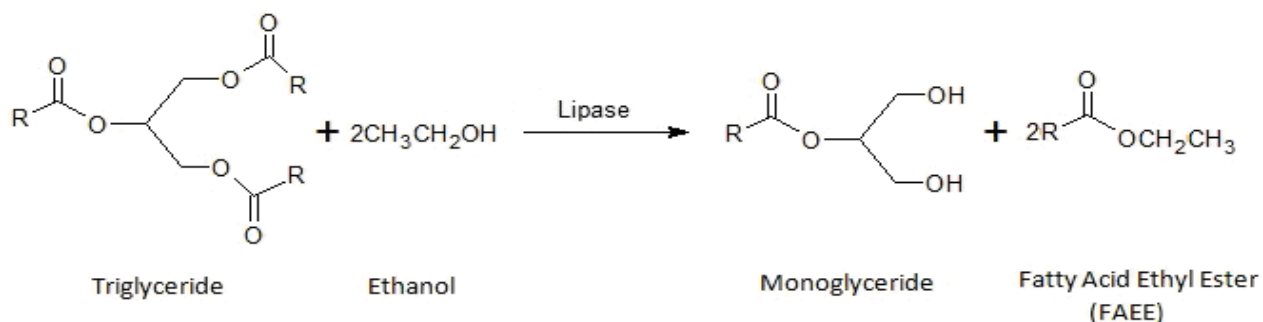


Figura 1.9. Ecodiesel-100®, es un biocombustible obtenido por tecnología enzimática y patentado por la Universidad de Córdoba (UCO) que incorpora la glicerina en forma de monoglicérido, que está formado por dos moles de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE) y un mol de monoglicérido (MG).

En comparación con el método convencional, las condiciones de funcionamiento son mucho más suaves, sin impurezas que deban eliminarse de la mezcla final y el biocombustible obtenido tiene unas propiedades fisicoquímicas similares a las del biodiesel convencional. Por último, pero no menos importante, el monoacilglicérido (MG) ha sido evaluado como agente lubricante del biodiesel [187-189]. Además, el etanol en exceso, no utilizado en el proceso enzimático permanece en la mezcla de reacción de tal manera que la mezcla de productos obtenida se puede utilizar directamente como parte del combustible. Algunos estudios [190-192] han demostrado que no existe ninguna diferencia significativa en las emisiones de CO₂, CO y NO_x entre diesel fósil y la mezcla de etanol y diesel. Sin embargo, el uso de estas mezclas da como resultado una reducción en la emisión de partículas. Por consiguiente, tales mezclas se pueden utilizar en un motor diesel sin ninguna modificación, teniendo en cuenta los cambios limitados obtenidos por el uso del diesel puro. Por lo tanto, la expresión Ecodiesel se atribuye actualmente a cualquier mezcla de ésteres alquílicos de ácido graso con etanol, sólo o con cualquier proporción de combustible diesel [190-193].

Por otro lado, el uso de biodiesel convencional en mezclas con diesel fósil para mejorar las emisiones y aumentar la lubricidad del combustible está aumentando rápidamente. En este sentido, mientras que la mayoría de las propiedades del biodiesel son comparables a las del combustible diesel, las propiedades de flujo (viscosidad) a baja temperatura siguen siendo uno de los principales retos a resolver al usar biodiesel como combustible alternativo para los motores diesel. En este sentido, se ha observado mediante el uso de etanol en mezclas una reducción considerable en el punto de fluidez de flujo en frío (viscosidad) [194]. Además, se obtiene un aumento en el rendimiento y se reducen las emisiones cuando se usa el etanol mezclado con el diesel y con biodiesel. El etanol mezclado con biodiesel es un combustible alternativo totalmente renovable y viable para mejorar el comportamiento de flujo en frío y mejorar las emisiones sin afectar al rendimiento del motor, por lo que el bioetanol mezclado con el gasóleo es una alternativa para incorporar una fracción renovable en los combustibles para vehículos. Esto está recibiendo cada vez mayor atención debido a sus ventajas económicas y ambientales [195].

El Ecodiesel presenta puntos de enturbiamiento y fluidez ligeramente más altos que el biodiesel convencional, pero hay que tener en cuenta que la presencia de etanol en forma de un excedente de la reacción de etanolisis compensa las características de flujo a bajas temperaturas. Además, se pueden utilizar varios aditivos para mantener las funciones químicas

básicas y para mejorar la ignición y la eficiencia de la combustión, así como la estabilización de tales mezclas de combustible [196].

La desventaja más importante del biodiesel convencional es su rendimiento en climas fríos, lo que puede llegar a comprometer su viabilidad comercial. Así, existen evidencias de que los ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de soja desarrollan problemas de operabilidad a temperatura ambiente aproximadamente 0 °C. En contraste, el diesel fósil desarrolla problemas similares en un rango de temperatura significativamente más baja, entre -16 y -20 °C. Por otro lado, un obstáculo importante para la aceptación comercial del biodiesel convencional es la tendencia a producir la obstrucción de los filtros. Esto se debe a la producción de precipitados que se pueden atribuir a la formación de ésteres glucósidos o a monoacilgliceroles poco solubles en biodiesel [197-199]. Los monoacilgliceroles (MG) afectan a las propiedades de flujo en frío del biodiesel, a través de sus efectos sobre el punto de enturbiamiento (CP, Cloud Point), el punto de congelación (FP, Freezing Point), punto de obstrucción del filtro por frío (CFPP, Cold Filter Plugging Point), y el punto de aparición de cera (WAP, Wax Appearance Point). Estos parámetros son los más afectados por la presencia de MGs debido a que tienen menor solubilidad en biodiesel y pueden formar residuos sólidos durante el almacenamiento en frío. En este sentido, los monoglicéridos puros pueden dar problemas debido a las transiciones de fusión entre 25-33 °C. A pesar de esto, los datos de solubilidad para mezclas FAME-MG presentan un amplio rango de temperatura de transición de sólido a líquidos.

Así, con la presencia de grandes cantidades de MG se produce un aumento en los puntos de CP, FP y CFPP [197]. Además, la formación de precipitado durante el almacenamiento del biodiesel a bajas temperaturas depende no sólo de la concentración de la mezcla, sino también del material empleado en su fabricación. Por ejemplo, en el biodiesel obtenido a partir de aceite de soja, los esteril glucósidos son la causa principal de la formación de precipitados, mientras que para el biodiesel obtenido a partir de grasa de aves de corral, los precipitados se deben principalmente a monoglicéridos. Los precipitados producidos en un biodiesel de aceite de semilla de algodón son debidos tanto a los esteril glucósidos como a los monoglicéridos [198-199].

Estudios recientes han demostrado que muestras de biodiesel con pobres propiedades de flujo en frío se mejoran mediante su mezcla con muestras de biodiesel con mejores propiedades de flujo en frío [200]. Sin embargo, la eliminación de componentes menores, tales

como los esteril glucósidos y los monoglicéridos no mejoraron el CFPP [201]. En consecuencia, el Ecodiesel podría tener algunas limitaciones más que el biodiesel convencional, cuando se opera a bajas temperaturas, pero esta desventaja se puede resolver utilizando mezclas adecuadas de diesel y etanol. En este sentido, esta metodología debe ser diseñada específicamente teniendo en cuenta el tipo de aceite usado como materia prima para su fabricación, así como las condiciones climáticas en que se usará el biocombustible. En mezclas con diesel, en concentraciones relativamente bajas, B20 – B30, prácticamente no deben apreciarse diferencias no sólo en lo que respecta al tipo de biocombustible, Ecodiesel/biodiesel o a la materia prima empleada para su producción.

1.2.7. Perspectivas para el futuro

Hoy en día existen una serie de metodologías alternativas, en diferentes etapas de desarrollo, capaces de producir biocombustibles adecuados para el reemplazo de diesel de origen fósil y sin generación de glicerina. En la Tabla 1.1 se muestra un resumen de los pros y los contras de las diferentes metodologías existentes para la obtención de biocombustibles sin glicerina. Como se puede ver se obtienen varias ventajas sobre biodiesel convencional cuando los biocombustibles como el biodiesel similar al diesel fósil (“green diesel”) son producidos por la tecnología de hidrotratamiento, cuando se integra dentro de una refinería de las actualmente empleadas para el tratamiento del petróleo y reducir los contenidos de azufre del crudo. El hidrógeno necesario para la reacción se encuentra disponible fácilmente en la propia refinería, y la producción es muy simple, ya que se basa en la mezcla de triglicéridos con los productos petrolíferos que se someten al tratamiento de desulfuración. Además, todos los productos de la reacción son los mismos compuestos a base de hidrocarburos superiores que se encuentran en los productos de refinería normales y no requieren ninguna manipulación especial, de modo que los productos a base de hidrocarburos obtenidos, pueden ser fácilmente mezclados con productos de refinería convencionales en cualquier proporción.

Tabla 1.1. Resumen de los tipos de biocombustibles existentes en la actualidad, diferenciándolos en su similitud al diesel fósil o al biodiesel regido por la normativa EN 14214.

Biofuel Type	Biodiesel EN 14214	Petrodiesel-like biofuels	Biodiesel-like biofuels		
			Gliperol®	DMC-BioD®	Ecodiesel®
Name	Biodiesel	Green diesel	Gliperol®	DMC-BioD®	Ecodiesel®
Reactive	Methanol or Ethanol	H ₂	Methyl acetate	Methyl carbonate	Ethanol
Catalyst	NaOH or KOH	Hydrotreating Ni-Mo type	Acid, Basic or Lipases	Basic or Lipases	Lipases
Products	3 FAME or 3 FAEE	Hydrocarbons C7-C18	Glycerol triacetate + 3 FAME	Fatty acid Glycerol Carbonate + 2 FAME	Monoglycerides + 2 FAEE
Byproducts	Glycerol	CO, CO ₂ , O ₂ , N ₂ , H ₂ S, and C1-C6 hydrocarbons	No waste	No waste	No waste
Separation process	Complex	Simple	Not needed	Not needed	Not needed
Investment facilities	Medium	Low (High, if the hydroprocessing facilities are not available)	Low	Low	Low
Free fatty acids and/or water in the starting oil	Free fatty acids are Transformed to soaps.	Free fatty acids are transformed to biofuel	Free fatty acids are transformed to biofuel	Free fatty acids are transformed to biofuel	Free fatty acids are transformed to biofuel
Catalyst cost	Low	Medium	Low (High if lipases)	Low (High if lipases)	High
Environmental impact	High. Alkaline and saline effluents are generated. Wastewater treatment is needed.	Low	Low	Low	Low

Teniendo en cuenta el procedimiento totalmente seguro para obtener biocombustibles como el green-diesel por hidrotreamiento de aceites y grasas de carácter renovable, en instalaciones de hidro-procesamiento convencionales en refinerías, que se están utilizando para reducir el azufre presente en los combustibles fósiles, se debería revisar el marco legal para obligar a que las empresas petroleras incorporen material renovable, para cumplir con los porcentajes de sustitución de combustibles fósiles por materias primas renovables.

Por otro lado, hay algunas otras metodologías en fase de desarrollo, que pueden producir biocombustibles como el biodiesel, evitando la generación de glicerina o cualquier otro subproducto (eficiencia atómica del 100%). Además, estos biocombustibles presentan propiedades lubricantes superiores a los combustibles fósiles y al biodiesel convencional. El mayor contenido de oxígeno con respecto al diesel de petróleo también asegura una combustión más completa y un menor contenido de CO, hidrocarburos, y partículas en las emisiones.

Al mismo tiempo, estas tecnologías que integran la glicerina como derivados (acetato de glicerol, ésteres de carbonato de glicerol de ácidos grasos o como monoglicéridos simplemente), también se pueden aplicar provechosamente a una muy pequeña escala de producción y con una inversión mínima, en comparación con las refinerías de petróleo actuales. Por lo que pudiera ser instalado en áreas cercanas a donde se producen cultivos (convirtiéndose la planta de biocombustible en un tratamiento adicional después de la extracción del aceite de los cultivos). De este modo se convierte en una tecnología competitiva para la producción de biocombustible en las zonas de baja productividad o zonas geográficamente dispersas, donde son muy limitantes los problemas logísticos.

Como podemos ver a continuación, los procesos de producción de biocombustibles como el biodiesel por interesterificación de aceite vegetales con acetato de metilo o carbonato de metilo (Figura 1.10), o los biocombustibles obtenidos por etanolisis selectiva de aceites vegetales utilizando lipasas como biocatalizador (Figura 1.11), son comparativamente más simples que el proceso de producción de biodiesel convencional (Figura 1.4).

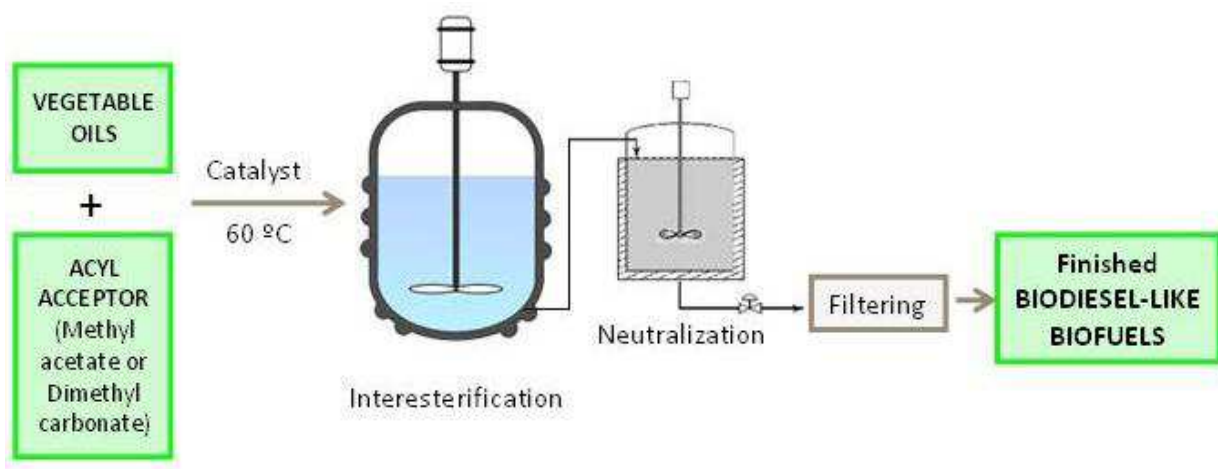


Figura 1.10. Procesos de producción de biocombustibles como el biodiesel por interesterificación de aceites vegetales con acetato de metilo o carbonato de metilo.

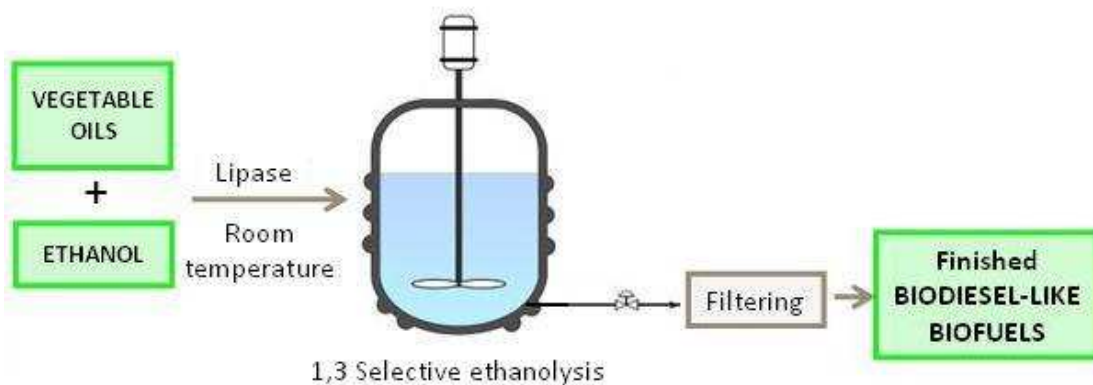


Figura 1.11. Proceso de producción de biocombustibles como el biodiesel mediante etanolisis selectiva de aceites vegetales usando lipasas como biocatalizadores.

El desarrollo y la maduración de estas nuevas tecnologías que no generan subproductos y reducen los costes de agua y energía, se espera sean capaces de impulsar el uso de biocombustibles, y crear un escenario de oportunidades para las pequeñas y medianas empresas en la producción de biocombustibles en muy diversas áreas geográficas (pudiendo producir sus biocombustibles "in situ"). De este modo, la agricultura puede desempeñar un papel muy importante a través de la producción de nuevos cultivos capaces de suministrar energía a sectores que ahora son totalmente dependientes del petróleo.

Por lo tanto, debería ser una prioridad la modificación del marco legal en lo que respecta a la sustitución gradual y continuada de combustibles fósiles por nuevos biocombustibles, para permitir que puedan tener la oportunidad de llevar a cabo la función inicialmente asignada en exclusiva al biodiesel convencional, según la norma EN 14214, que marca las condiciones que se muestran en la Tabla 1.2. Este nuevo escenario legal permitiría el establecimiento de empresas de base tecnológica, en las que se lleve a cabo la maduración de estas tecnologías para conseguir sustituir el uso de combustibles fósiles de manera gradual, evitando de esta manera una crisis energética no deseada.

Tabla 1.2. Normativa Europea sobre biodiesel, EN 14214.

Propiedad	Unidad	Límites	Método de Ensayo
Contenido en éter	% (m/m)	Min. 96,5	EN 14103
Densidad a 15 °C	kg/m ³	860-900	EN ISO 14105
Viscosidad cinemática a 40°C	mm ² /s	3,5-5	EN ISO 3104
Punto de inflamación	°C	Min. 120	EN ISO 3679
Contenido de azufre	mg/kg	Máx. 10	EN ISO 20846/20884
Residuo carbonoso	% (m/m)	Máx. 0,30 (muestra 10%)	EN ISO 10370
Número de cetano	-	Min 51	EN ISO 5165
Contenido en cenizas sulfatadas	% (m/m)	Máx. 0,02	EN ISO 2987
Contenido en agua	mg/kg	Máx. 500	EN ISO 12937
Contaminación total	mg/kg	Máx. 24	EN ISO 12662
Corrosión en lámina de cobre (3h/50°C)	Clasificación	Clase 1	EN ISO 2160
Estabilidad a la oxidación 110°C	Horas	Min. 6	EN ISO 14112
Índice de acidez	mg KOH/g	Máx. 0,5	EN 14014
Índice de yodo	g yodo/100g	Máx. 120	EN ISO 14111
Éster metílico de ácido linolénico	mg/kg	Máx. 12	EN 14103
Ésteres metílicos poliinsaturados	mg/kg	Máx. 1	En desarrollo
Contenido de metanol	% (m/m)	Máx. 0,2	EN 14110
Contenido en monoglicéridos	% (m/m)	Máx. 0,8	EN ISO 14105
Contenido en diglicéridos	% (m/m)	Máx. 0,2	EN ISO 14105
Contenido en triglicéridos	% (m/m)	Máx. 0,2	EN ISO 14105
Glicerol libre	% (m/m)	Máx. 0,02	EN 14105/14106
Glicerol total	% (m/m)	Máx. 0,25	EN 14105
Sales Metálicas (Na+K)	mg/kg	Máx. 5	EN 14108-14109
Sales Metálicas (Ca+Mg)	mg/kg	Máx. 5	EN 14538
Contenido en fósforo	mg/kg	Máx. 10	EN 14107

1.3. Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, cuyo interés reside principalmente en las siguientes características:

1) Las enzimas son *biocatalizadores* que disminuyen la energía de activación necesaria para que las reacciones se desarrollen y aumenten su velocidad de reacción (Figura 1.12). Presentan una actividad catalítica más eficaz que los catalizadores inorgánicos; por ejemplo, la energía necesaria para que se produzca la reacción de descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno es de 75 KJ/mol, en ausencia de catalizador; 50 KJ/mol, en presencia de platino y disminuye hasta 8 KJ/mol, en presencia de la peroxidasa. Este efecto tan drástico sobre la energía de activación en presencia de enzimas se debe a la formación de un complejo intermedio enzima-sustrato, que posteriormente se transforma en producto y enzima.

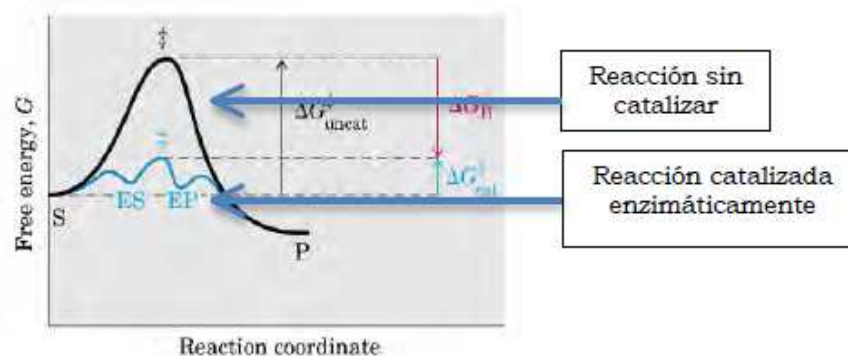


Figura 1.12. Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación de una reacción.

2) Las enzimas son *selectivas*, tanto para la reacción que catalizan, como para los sustratos que reconocen. Además, presentan un elevado grado de estereo y regioselectividad (en general, aceleran más el proceso con un isómero que con el otro, lo cual constituye una gran ventaja frente a los catalizadores químicos clásicos). La selectividad de las enzimas se debe a la formación del complejo enzima-sustrato, formado en una pequeña región de la enzima denominada centro activo, el cual suele estar localizado dentro de la estructura terciaria de la enzima. La especificidad enzimática reside en las propiedades de dicho centro activo (dimensiones, topología, alineamiento de grupos contraiónicos y regiones hidrófobas), que condicionan las características que debe reunir un determinado sustrato para acoplarse en esa región enzimática. Solamente un número reducido de aminoácidos están implicados en la

catálisis enzimática, los cuales no se localizan consecutivamente en la cadena polipeptídica, sino que se encuentran juntos tras el proceso de plegamiento enzimático.

La Tabla 1.3 compara las energías de activación para la descomposición del peróxido de hidrógeno, en ausencia o presencia de un catalizador. Se aprecia cómo el catalizador enzimático disminuye aún más la barrera energética que ha de superarse desde el nivel de reactivos para alcanzar el estado de transición. El alto poder catalítico de las enzimas se debe en parte a su alta especificidad por los sustratos, la cuál puede ser absoluta para un único sustrato o relativa, cuando permite la reacción de compuestos diferentes pero con una estructura similar.

Tabla 1.3. Descomposición enzimática del agua oxigenada, comparación de las energías de activación para la descomposición del peróxido de hidrógeno, en ausencia o presencia de un catalizador. (www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r52038.PDF)

Reacción	Catalizador	Temperatura (°C)	Energía (kcal/mol)
Descomposición de H ₂ O ₂	Ninguno	20	18
	Fe ²⁺	22	10
	Catalasa	22	1,7

Se han propuesto numerosos modelos para explicar la selectividad de las enzimas para un determinado sustrato. El modelo de "llave-cerradura" [202] ofrece una visión rígida de las enzimas y ha sido superado por el modelo de "acoplamiento o encaje inducido" [202,203], por el cual el sustrato induce la orientación de los residuos en el centro activo para que se unan al centro de fijación y se desarrolle la reacción. La selectividad de las enzimas es la base de sus aplicaciones en Síntesis Orgánica, que permite llevar a cabo, por ejemplo, transformaciones muy selectivas con estructuras quirales y polifuncionales.

3) Las enzimas pueden ser objeto de *regulación*; es decir, su actividad catalítica puede estar determinada por la concentración de sustratos, productos y otras sustancias químicas presentes en el medio; las cuales pueden producir, tanto su activación como su inhibición.

4) Las enzimas *se degradan en condiciones relativamente suaves*, por lo que requieren una manipulación más delicada que los catalizadores químicos. Las enzimas se pueden desnaturalizar por diversos mecanismos como: la acción de proteasas, presentes como agentes

contaminantes en las preparaciones enzimáticas; los cambios bruscos de las condiciones del medio que pueden alterar la conformación enzimática; las contaminaciones microbianas; los procesos de autooxidación, etc.

Algunos de los principales inconvenientes que presentan los procesos catalizados por enzimas (la inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto a sustrato) se han podido superar mediante diferentes procedimientos como:

a) Transformación estereoselectiva de algunos sustratos, que conduce a la obtención de intermedios o productos de gran interés en Síntesis Orgánica.

b) El desarrollo de técnicas (como la inmovilización enzimática) que permiten mejorar la estabilidad de las enzimas y facilitar su posterior recuperación y reutilización [204-206], siendo posible la utilización de estas enzimas como biocatalizadores en procesos industriales.

c) Los avances en Biología Molecular y las nuevas tecnologías del ADN recombinante han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas enzimas en grandes cantidades [207-209]. Estas técnicas han permitido abaratar notablemente el precio de las enzimas y modificar selectivamente algunas propiedades enzimáticas.

d) La limitación debida a la insolubilidad de determinados sustratos en agua, que impedía el desarrollo de las reacciones enzimáticas, ha sido superada mediante la utilización de sistemas bifásicos [210] o la adición de pequeñas concentraciones de cosolventes orgánicos (etilenglicol, glicerol o dimetilsulfóxido), sin alterar las propiedades y características del biocatalizador [211,212].

1.3.1. Evolución histórica

La denominación de enzima ("en la levadura") no se empleó hasta 1877, pero mucho antes ya se sospechaba que ciertos catalizadores biológicos intervenían en la fermentación del azúcar para formar etanol, de ahí el nombre inicial de fermentos. La primera teoría general sobre la catálisis química fue publicada en 1835 por J.J. Berzelius, el cual incluía en su artículo un ejemplo de lo que ahora se conoce como enzima, la diastasa de malta, y señalaba que la

hidrólisis del almidón catalizada por la diastasa era más eficaz que la catalizada por ácido sulfúrico. Luis Pasteur en 1860 reconoció que la fermentación era catalizada por enzimas y en 1897 E. Büchner consiguió extraer de las células de la levadura las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica. Sin embargo, fue en 1926 cuando J.B. Sumner aisló por primera vez una enzima en forma cristalina; se trataba de una ureasa aislada de extractos de la alubia *Cannavalia enzyformis*. Sumner observó que estos cristales estaban constituidos por estructuras proteicas y llegó a la conclusión de que las enzimas eran proteínas. No obstante, sus puntos de vista no fueron aceptados hasta que Northrop, entre 1930 y 1936, aisló la pepsina, tripsina y quimotripsina cristalizadas [213].

1.3.2. Clasificación y nomenclatura

Las enzimas se han clasificado sistemáticamente en seis clases principales [213], cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada por cada una de ellas (Tabla 1.4). Las enzimas que se han estudiado en la presente tesis doctoral son varias lipasas que vienen definidas por el número E.C. 3.1.1.3, donde E.C. son las abreviaturas de Comisión de Enzimas, la primera cifra «3» representa el nombre de la clase (hidrolasa), la segunda cifra «1» representa a la subclase (enlace que hidroliza, esterasa), la tercera cifra «1» a la sub-subclase (esterasa que reconoce ésteres del glicerol) y la cuarta cifra «3» designa a la glicerol-éster-hidrolasa de ácidos de cadena larga.

Tabla 1.4. Clasificación internacional de enzimas (denominación, números de código y tipos de reacciones).

1. OXIDO REDUCTASAS (Reacciones de óxido-reducción)	1.1. Actúan sobre alcoholes >-OH
	1.2. Actúan sobre cetonas >C=O
	1.3. Actúan sobre alquenos >C=CH
	1.4. Actúan sobre grupos amino -NH ₂
	1.5. Actúan sobre grupos imino =NH
2. TRANSFERASAS (Transferencia de grupos funcionales)	2.1. Grupos de un átomo de C
	2.2. Grupos carbonilo
	2.3. Grupos glucosilo
	2.4. Grupos fosfato
	2.5. Grupos que contienen azufre
3. HIDROLASAS (Reacciones de hidrólisis)	3.1. Esteres
	3.2. Enlaces glucosídicos
	3.3. Enlaces peptídicos
	3.4. Otros enlaces C-N
	3.5. Anhídridos de ácido
4. LIASAS (Adición a dobles enlaces)	4.1. >C=C<
	4.2. >C=O
	4.3. >C=N-
5. ISOMERASAS (Reacciones de isomerización)	5.1. Racemasas
6. LIGASAS (Formación de enlaces con escisión de ATP)	6.1. Entre átomos de C y O
	6.2. Entre átomos de C y S
	6.3. Entre átomos de C y N
	6.4. Entre átomos de C y C

1.3.3. Catálisis enzimática en disolvente orgánicos

Durante los últimos años el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales [214]. En efecto, las enzimas incorporan a menudo una alta quimio, regio, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la Química Fina. Además, las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves (temperatura ambiente y pH neutro), las velocidades de reacción aumentan notablemente, y son menos peligrosas, contaminantes y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales.

El tremendo potencial de las enzimas como catalizadores está ampliamente reconocido; sin embargo, cuando su empleo se restringe a su medio natural acuoso, su utilidad y alcance está limitado por una serie de consideraciones. Así, la mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, pudiendo tener lugar reacciones colaterales no deseadas, el equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua, y la recuperación de los productos es compleja, ya que el agua es un disolvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización.

En principio, muchos de los problemas se resuelven usando disolventes orgánicos en lugar de agua como medio de reacción. A primera vista tal sustitución parecería imposible debido a la idea convencional de que las enzimas (en general las proteínas) se desnaturalizan (pierden su estructura nativa y su actividad catalítica) en disolventes orgánicos. Sin embargo, esta noción proviene de examinar a las enzimas en mezclas de aguas con disolventes orgánicos y no en disolventes orgánicos puros. Las proteínas tienden a desnaturalizarse en las mezclas de agua con disolventes orgánicos porque tienen suficiente flexibilidad conformacional para ello; sin embargo, en presencia de disolventes orgánicos “secos” (en ausencia de agua, que actúa como lubricante molecular), donde su tendencia a desnaturalizarse es mayor, las enzimas se mantienen muy rígidas al carecer de la flexibilidad necesaria para poder hacerlo [215]. Por ello, la conformación nativa de las enzimas se retiene en gran medida en disolventes orgánicos, de modo que muchas enzimas son capaces de catalizar reacciones en medios no acuosos [216], como ha quedado bien demostrado, durante los últimos 20 años, ya que la utilidad tecnológica de las enzimas se puede aumentar de forma espectacular [217].

Las transformaciones biocatalizadas en disolventes orgánicos ofrecen, entre otras, las siguientes ventajas [218]:

- 1) Posibilidad de efectuar la catálisis de reacciones que son desfavorables en agua.
- 2) Supresión de reacciones colaterales inducidas por el agua, como la hidrólisis de determinados grupos capaces de sufrirla, al emplear un medio orgánico.
- 3) Solubilización de determinados compuestos hidrofóbicos (insolubles en agua) en medios orgánicos y su aplicación como sustratos en procesos enzimáticos.
- 4) Recuperación más fácil de muchos productos debido a que no es necesaria una etapa de extracción en el proceso general de la reacción.
- 5) Recuperación más fácil de los biocatalizadores, al ser insolubles en disolventes orgánicos (tanto en forma libre como inmovilizada), mediante una simple filtración, permitiéndose en muchos casos su reutilización y reciclado.
- 6) Incremento de la termoestabilidad del biocatalizador, al menos mientras el contenido en agua se mantenga suficientemente bajo.
- 7) La selectividad enzimática puede verse afectada de forma importante, e incluso cambiar según el disolvente empleado.

1.3.3.1. Estructura enzimática y estabilidad en disolventes orgánicos

Se pueden distinguir dos tipos de inestabilidad enzimática de origen térmico. El primer tipo consiste en la pérdida gradual e irreversible de la actividad al degradarse la estructura primaria, al someter las enzimas a altas temperaturas. El segundo proviene de la pérdida de la estructura superior, catalíticamente activa, por el desplegamiento cooperativo de las macromoléculas enzimáticas, inducido por el calor. El agua es el principal responsable de ambos tipos de desactivación, ya que promueve la movilidad conformacional de las proteínas así como los diversos procesos degradativos [219]. Por tanto, cabría esperar que las enzimas fueran más termoestables en disolventes orgánicos que en agua. Esta predicción se ha demostrado

experimentalmente con ejemplos como el de la lipasa pancreática de cerdo (PPL), que tiene una vida media de varias horas a 100 °C en disolventes anhidros, cuando en agua se desactivaría en unos segundos a esa temperatura [220]. La vida media de la enzima en un disolvente orgánico decrece bruscamente cuando se aumenta el contenido en agua.

Diversos trabajos, demuestran efectivamente que las enzimas son muy termoestables en disolventes orgánicos anhidros debido a la rigidez conformacional en el estado deshidratado y a la ausencia de las principales reacciones covalentes responsables de la inactivación térmica irreversible de las enzimas en disolución acuosa (hidrólisis de enlaces peptídicos, desamidaciones de residuos de Asn/Glu, intercambios de puentes disulfuro, β -eliminaciones en residuos de cisteína) [221].

Una de las formas típicas en las que se emplean las enzimas en medios no acuosos es como sólidos liofilizados. Se han llevado a cabo estudios mediante espectroscopía FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) que demuestran que la liofilización, que implica una deshidratación, provoca cambios reversibles en la estructura secundaria de las proteínas produciéndose un incremento en el contenido en láminas β y un descenso en el de α -hélices [222]. Es importante tener en cuenta estos cambios producidos en la estructura secundaria a la hora de estudiar las diferencias en la actividad catalítica de las enzimas en agua frente a los disolventes orgánicos.

La integridad estructural de proteínas liofilizadas ha sido estudiada también por RMN en medio no acuoso [223] poniéndose de manifiesto que ciertos disolventes como el acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo o butanol no afectan a la proteína (no causan desnaturalización, aparte de la ya producida durante el proceso de liofilización).

1.3.3.2. Actividad enzimática en disolventes orgánicos

La actividad enzimática en los disolventes orgánicos depende en gran medida de factores tales como la actividad termodinámica del agua [224-227], la solvatación del sustrato y el producto en el disolvente empleado, el control del pH, la forma enzimática y la naturaleza del disolvente.

- *Valores de pH y su control. Efecto memoria*

El estado de protonación de los distintos grupos ionizables de una enzima es importante para la actividad enzimática, tanto en medios acuosos como en un disolvente orgánico. En agua, la ionización se puede controlar mediante ajustes de pH, pero en medio orgánico la situación es más complicada, de hecho, en disoluciones no acuosas el concepto de pH no tiene un claro sentido [228,229]. Lo que sí se ha demostrado es que en los disolventes orgánicos las enzimas tienen “memoria de pH”, de modo que su actividad catalítica refleja el pH de la solución acuosa de la cual fueron recuperadas (mediante liofilización o precipitación). Este fenómeno se debe a que los grupos ionizables de la proteína retienen su último estado de ionización en el proceso de deshidratación (o precipitación) y el subsiguiente emplazamiento en los disolventes orgánicos (de ahí que se emplee el término “memoria”).

Consecuentemente, la actividad enzimática en los disolventes orgánicos se puede mejorar mucho si la enzima se liofiliza (o precipita) a partir de su solución acuosa al pH óptimo para la catálisis.

- *Forma enzimática*

Las proteínas, si no reciben ningún tratamiento especial, son prácticamente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, incluyendo sistemas anhidros y aquellos con un porcentaje pequeño de agua disuelta. Por tanto, las enzimas suelen estar presentes en los disolventes orgánicos como suspensiones bifásicas sólido-líquido, lo cual simplifica la separación del producto-biocatalizador y la reutilización de la enzima.

A continuación, se tratan las distintas formas en las que se puede emplear una enzima para biocatalizar procesos en medio no acuoso:

(a) *En polvo.*

La manera más simple de preparar un biocatalizador para su uso en un disolvente orgánico y, al mismo tiempo, ajustar los parámetros clave como el pH, es mediante la liofilización o precipitación de las correspondientes soluciones acuosas (por ejemplo por adición de acetona). Sin embargo, estas preparaciones pueden dar lugar a limitaciones por difusión o impedir la

interacción enzima-sustrato debido al apilamiento proteína-proteína. Para evitar este inconveniente se recomienda la utilización de partículas pequeñas de enzima obtenidas por sonicación, así como la agitación vigorosa durante la reacción.

La liofilización es un proceso fisicoquímico, resultado de una congelación seguida de una sublimación y desorción [230]. Los cambios estructurales que se producen durante la liofilización de una enzima reducen su actividad catalítica en medio orgánico respecto al agua. Estos cambios son reversibles si la enzima liofilizada se vuelve a disolver en medio acuoso, pero no lo son (debido a la rigidez conformacional) si la enzima se suspende en disolventes orgánicos. Este efecto no deseado de desnaturalización parcial de la enzima puede minimizarse o incluso prevenirse si se lleva a cabo la liofilización de la misma en presencia de ciertos excipientes o aditivos (orgánicos e inorgánicos). Dichos excipientes promueven la activación de la enzima a través de diversos mecanismos [231].

(b) Inmovilizada.

La inmovilización reduce las limitaciones por difusión que presentan las enzimas suspendidas en disolventes orgánicos. Cuando la enzima está dispersa sobre la superficie del soporte sólido, el acceso a las moléculas individuales de la proteína se mejora, a la vez que se reduce la agregación de las partículas de proteína. Además, las enzimas, como las lipasas, que funcionan óptimamente en interfases se benefician del aumento de la superficie interfacial que conlleva la inmovilización de la proteína.

La adsorción de una enzima en un soporte macroscópico es la manera más sencilla y antigua de inmovilizar proteínas. Las fuerzas que intervienen en el proceso de adsorción son de distinta naturaleza (Van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno), y relativamente débiles, por lo cual, las pérdidas de actividad enzimática generalmente son leves.

Además, la desorción de la proteína del soporte no puede ocurrir en disolventes no polares donde la proteína es totalmente insoluble. El enlace covalente de una enzima a un soporte macroscópico da lugar a la formación de enlaces químicos estables entre ambos, lo cual evita completamente su separación aunque el biocatalizador se encuentre en agua.

En muchas ocasiones, se requieren condiciones relativamente drásticas para llevar a cabo la inmovilización, lo que da lugar a pérdidas de actividad inevitables (en torno al 50% respecto a la enzima nativa). Los grupos funcionales de la enzima implicados en la unión covalente son nucleófilos (grupos N-terminales y ϵ -amino de residuos de lisina, grupos carboxilo, hidroxilo, tiol y fenólicos).

El uso de enzimas en forma de cristales entrecruzados (*cross-linked enzyme crystals*, CLEC) es otra alternativa posible para la biocatálisis en disolventes orgánicos. Básicamente se trata de microcristales de enzima que son entrecruzados covalentemente (usualmente con glutaraldehído). Se trata de preparaciones muy robustas y estables a altas temperaturas en medios acuosos (donde tampoco son solubles). Además, las enzimas en forma CLEC son resistentes a la proteólisis, ya que las proteasas no penetran la matriz del cristal. Actualmente existen enzimas preparadas como CLEC disponibles comercialmente [232].

(c) *Soluble*

Para minimizar las limitaciones por difusión y maximizar las interacciones entre la enzima y el sustrato, se han empleado distintas estrategias para solubilizar los biocatalizadores en disolventes orgánicos. El método más conocido se basa en enlazar covalentemente el polímero polietilenglicol a las macromoléculas de enzima [233]. Los complejos así preparados dan lugar a soluciones transparentes, al emplearlos disueltos en diferentes disolventes orgánicos [234].

- *Selectividad enzimática en disolventes orgánicos. Ingeniería del medio.*

La selectividad es una de las principales propiedades de la catálisis enzimática y es intrínseca de la enzima. Para alterar la selectividad debe modificarse la molécula de enzima, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida. Este concepto es correcto al referirse a una enzima que actúe en agua, pero deja de tener validez (en sentido parcial) si el proceso enzimático se lleva a cabo en disolventes orgánicos. De hecho, hay bastantes ejemplos en los que los distintos tipos de selectividad enzimática se modifican al pasar de un disolvente orgánico a otro, como la selectividad de sustrato, enantiomería, proquiral y la quimio- y regioselectividades [235].

El término “ingeniería del medio” se refiere a esta posibilidad de modificar las propiedades de una enzima determinada mediante un simple cambio de la naturaleza del disolvente en el que

la reacción tiene lugar. El amplio abanico de disolventes orgánicos con distintas propiedades fisicoquímicas, como el momento bipolar, solubilidad, punto de ebullición, constante dieléctrica, cadena lineal o cíclica, etc, permite llevar a cabo estas modificaciones en la naturaleza del medio de manera sencilla.

Los datos descritos disponibles muestran que, para modificar o mejorar la selectividad enzimática, la ingeniería del medio representa una alternativa, o al menos, un complemento útil a la ingeniería de proteínas o a la laboriosa búsqueda de nuevos biocatalizadores. En general, se han planteado distintas hipótesis para justificar este fenómeno [236]. Por ejemplo, el disolvente en función de su polaridad podría modificar la conformación de la enzima en cierto grado y por tanto, influir en la selectividad al alterar el proceso de reconocimiento molecular entre la enzima y el sustrato. Otra hipótesis se basa en el hecho de que la selectividad depende de la energética de la solvatación del sustrato. Finalmente, hay modelos que afirman que las moléculas del disolvente podrían unirse al centro activo y, dependiendo de su estructura, interferir con la asociación o transformación de, por ejemplo, un enantiómero más que otro.

1.3.3.3. Inmovilización de enzimas

En los últimos años la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente, sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, alimentos y fármacos. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, como son, una gran actividad catalítica, y especificidad de sustrato, y una alta actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de las enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de ellas no son estables en las condiciones de trabajo, y al ser solubles en agua su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto no se pueden reutilizar. La inmovilización de las enzimas permite en muchos casos superar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea competitivo y económicamente rentable.

Inicialmente se consideró la inmovilización de enzimas a aquel proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente [237]. Posteriormente, esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen,

completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte [238].

En general, el empleo de enzimas inmovilizadas presenta una serie de ventajas con respecto a la utilización de enzimas en disolución, ya que, no sólo mejoran de forma muy importante la economía del proceso, al poderse reutilizar las enzimas, sino que también facilitan su manejo en los sistemas de reactores industriales. Así, de forma resumida se pueden destacar [239]:

- Posibilidad de adición y extracción de la mezcla reaccionante.
- Aumento de la actividad de la enzima, en muchos casos.
- Estabilidad a mayores intervalos de pH.
- Utilización de reactores enzimáticos de fácil manejo y control, adaptados a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos sistemas de reactores permiten el empleo de cargas elevadas de enzimas, que mantienen su actividad durante más tiempo, y el reciclado, que posibilita la obtención de productos con mayor pureza.
 - Reutilización de la enzima.
 - Posibilidad de trabajar a temperaturas más elevadas debido a la estabilización, con lo que se aumenta la velocidad de reacción y se evita la contaminación microbiana.

En lo que se refiere a las desventajas inherentes al empleo de las enzimas inmovilizadas, aparte de la dificultad intrínseca para mantenerlas activas, respecto a su empleo en disolución, en forma libre, podemos destacar:

- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo puede influir de forma negativa.
- La disminución de la productividad por unidad de peso o volumen. Esto es debido a que, en general, menos del 5 % de un sistema de enzima inmovilizada está constituido por la propia enzima, siendo el resto soporte inerte.
- La necesidad de utilizar soportes con un gran poder de adsorción, es decir, con una elevada superficie específica y alto número de centros activos superficiales, normalmente ácidos, sobre los que provocar la inmovilización. De ahí que, sea necesario desarrollar métodos más eficientes de inmovilización para reducir las limitaciones de las técnicas actualmente disponibles

y para promover el empleo de las enzimas como catalizadores suficientemente económicos para su aplicación, tanto a escala preparativa como a escala industrial.

A lo largo de las tres últimas décadas se han descrito diferentes métodos de inmovilización, sobre distintas estructuras insolubles que actúan como soportes. Así, existen numerosos métodos para conseguir la fijación de las enzimas a los soportes [240]. Como procedimientos de inmovilización más característicos [241], podemos destacar:

A) *RETENCIÓN FÍSICA*

A.1. *Atrapamiento*

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero y la polimerización por un cambio de temperatura o adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o fibras. En el primer caso la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. Una ventaja adicional es que la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura; sin embargo, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.

A.2. *Inclusión en membranas*

Se puede dividir en dos tipos:

(a) *Microencapsulación*

En esta técnica las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas del sustrato y producto, pero no de la enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes o no permanentes. Las microcápsulas pueden ser esféricas (poros de 1-100 μm \varnothing). Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente

una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

(b) Reactores de membrana.

El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas: mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana y por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.

B) RETENCIÓN QUÍMICA A UN SOPORTE.

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable para la posterior reutilización. Así, los principales métodos son:

B.1. Unión de la enzima a la superficie del soporte por adsorción física.

La adsorción física fue la primera forma de inmovilización utilizada, ya que se basa en el mismo método empleado para la purificación de las enzimas. Éstas se adsorben sobre carbón, caolinita u otro soporte inorgánico, celulosas iónicas, o diversas resinas orgánicas de intercambio iónico, y se comprueba que, en mayor o menor medida, mantienen actividad enzimática. Esta técnica es la más fácil de efectuar, apenas produce desactivación y permite regenerar el soporte con enzimas frescas pero, en teoría, es la menos efectiva, ya que las enzimas, al no estar unidas con suficiente fuerza, se solubilizan muy fácilmente. No obstante, las primeras aplicaciones industriales de las enzimas se han basado en estos procedimientos [242].

En efecto, la primera aplicación industrial de las enzimas data del año 1969, en el que la compañía Tanabe Seiyaku incorpora por adsorción la enzima *penicilina-G acilasa*, o *aminoacilasa* (N-acilaminoácido hidrolasa, EC 3.5.1.14), procedente del *Aspergillus oryzae*, a una resina DEAE-Sephadex, y la utiliza en la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos, obtenidos por síntesis química. La producción actual de L-aminoácidos, empleando este método, se cifra en más de 100.000 Tn anuales.

B.2. Encapsulamiento de la enzima en el retículo poroso de un polímero orgánico o de un material inorgánico, generalmente de tipo zeolítico.

La encapsulación de las enzimas, se puede llevar a cabo mediante dos procedimientos muy generales:

(a) Polimerización de un monómero orgánico, en un medio en el que se encuentran disueltas las enzimas (células o microorganismos) al que se adicionan iniciadores de la polimerización, por ejemplo acrilamida, o 1,6-hexametilendiamina y el cloruro del ácido hexanodioico, para producir, poliacrilamida o nylon 6.

De hecho, la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos se sigue efectuando en diversas empresas con la misma enzima *penicilina-G acilasa*, pero atrapada en geles de poliacrilamida. Estos geles se preparan por diferentes tratamientos físicos de los polímeros ya formados. También se emplea el alginato de calcio, que se obtiene al gelificar el alginato de sodio en disoluciones de hidróxido de calcio, reteniendo las enzimas también en disolución.

(b) Precipitación de un gel, puramente inorgánico, en un medio en el que se encuentra disuelta la enzima. Así, se emplean diversos organosilanos, que por hidrólisis generan SiO₂ que, una vez "atrapadas", pueden incorporar diversas enzimas, por ejemplo lipasas [243]. En este sentido se observa un interés creciente sobre la preparación de materiales inorgánicos de porosidad controlada, más sofisticados, como pueden ser los tamices moleculares mesoporosos, tipo MCM-41. A éstos se pueden incorporar, por ejemplo, enzimas hidrolíticas: papaína y tripsina [244] o lipasas [245].

En general, los preparados enzimáticos, así obtenidos, suelen experimentar procesos de control de difusión por parte de los reactivos, ya que los retículos, orgánicos o inorgánicos,

dificultan el acceso de aquéllos a los centros activos de las enzimas. Otro inconveniente es la imposibilidad de regenerar el preparado, por adición de enzimas "frescas".

B.3. Entrecruzamiento o reticulación de la enzima con reactivos bifuncionales, generando micro cristales que permiten una cierta heterogeneización del proceso.

El entrecruzamiento o reticulación de la enzima con reactivos bifuncionales (CLEC), se basa en emplear las enzimas cristalizadas y reticuladas con reactivos como el glutaraldehído que, formando enlaces imínicos con los restos ϵ -amino de las lisinas, mantienen estabilizados los cristales, mejorando no sólo su facilidad de manejo, sino aumentando de forma muy importante su actividad catalítica y estabilidad frente a la temperatura, disolventes y otros agentes desnaturalizantes de las proteínas. Así, la termolisina, en CLEC, se ha aplicado con éxito a la producción industrial del edulcorante "aspartamo", trabajando a 55 °C, en acetato de etilo como disolvente [246].

Al igual que las enzimas inmovilizadas, los CLECs son insolubles en cualquier disolvente, por lo que se pueden recuperar, aumentan su estabilidad, y además poseen una mayor actividad por unidad de peso y/o volumen, ya que no contienen ningún soporte. Así, se ha descrito también la aplicación de lipasas CLEC en resoluciones de mezclas de enantiómeros, para la obtención de antiinflamatorios no esteroideos: cetoprofeno, ibuprofeno y fluorbiprofeno [247]. Esta metodología, presenta claras ventajas (se encuentran disponibles comercialmente cinco enzimas CLEC: la *penicilinacilasa*, dos lipasas y dos proteasas), pero también, algunos problemas relativos al control de difusión, menor resistencia mecánica que las enzimas inmovilizadas, y sobre todo, que parece, en principio, inaplicable a las enzimas de mayor precio, ya que todo el "sólido" catalítico está formado por enzimas purificadas y cristalizadas.

B.4. Formación de un enlace covalente entre la enzima y el soporte.

La formación de un enlace covalente entre la enzima y el soporte supone, en principio, el método "ideal" para unir la enzima a un soporte, ya que, de darse una serie de condiciones, será el que mejor optimice la alta selectividad de las reacciones enzimáticas con las propiedades químicas y mecánicas del soporte, Así, las enzimas se fijan al soporte en su superficie, de forma aislada unas de otras, por lo que cada macromolécula enzimática puede actuar de forma individual, sin ninguna interferencia con las restantes, lo que le confiere la máxima eficiencia

catalítica por unidad de peso de enzima y una importante reducción de las limitaciones debidas a la transferencia de masa, que es un inconveniente asociado a los restantes métodos de inmovilización.

Este "aislamiento" les confiere además mayor resistencia a la desactivación en condiciones extremas de funcionamiento, pH, temperatura, etc., pudiéndose, además, almacenar durante largo tiempo sin perder su actividad, pues ésta se produce muchas veces como consecuencia de interacciones interenzimáticas.

La aplicación de un método de inmovilización por unión covalente conlleva efectuar un tratamiento de activación de los grupos químicos superficiales del soporte, para que sea posible la reacción de éstos con los grupos nucleófilos de las proteínas. La activación debe realizarse en condiciones drásticas, incompatibles con la estabilidad de las enzimas, por lo que la inmovilización se ha de efectuar una vez que el soporte ha sido activado. Además, la elección del soporte es un aspecto primordial, ya que debe conciliar la facilidad para poder introducir en su superficie un elevado número de grupos funcionales (capaces de reaccionar con determinados restos nucleófilos de la cadena polipeptídica de la enzima) con sus propiedades químico-físicas y mecánicas.

A este respecto, la principal discriminación se produce al elegir entre un soporte inorgánico (vidrios porosos, sílice, alúmina, etc.) o un polímero orgánico, tipo poliestireno. En el primer caso tendremos mayores ventajas, respecto a su resistencia mecánica, frente al uso de disolventes orgánicos, etc., pero las dificultades para efectuar la inmovilización serán comparativamente mucho mayores, ya que es mucho más fácil conseguir la funcionalización de un polímero, que la de un sólido inorgánico.

En el primer caso servirá una resina tipo Merrifield, un poliestireno entrecruzado con divinilbenceno y con un determinado porcentaje de monómeros funcionalizados [248], como por ejemplo la p-vinil-bencilamina [249].

Un soporte de este tipo es poco resistente a los disolventes orgánicos, ya que se deforma (se "hincha"), y a las temperaturas elevadas. Sus mejores resultados se consiguen en disoluciones acuosas y a temperaturas bajas o no superiores al ambiente. No obstante, se han

inmovilizado diversas proteasas sobre polímeros de este tipo, funcionalizados con Ar-CH₂-Cl, -SO₃- ó -COOH, [250].

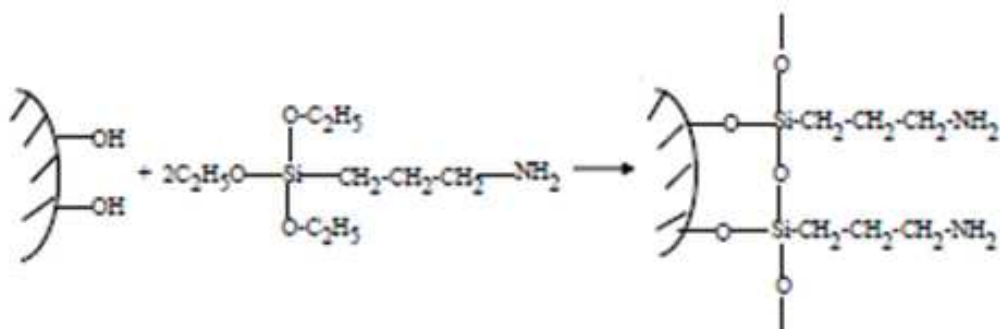
En la actualidad, el método más habitual para efectuar la activación de un soporte inorgánico pasa por la "silanización" de los grupos hidroxilos superficiales, con un organosilano. Ésto puede efectuarse por diversos métodos [251] (sol-gel, preactivación con cloro, postmodificación, etc.), pero el más habitual consiste en insertar una cadena hidrocarbonada (*grafting*), que contiene el grupo funcional con el que se efectuará la interacción con un determinado tipo de residuos de la enzima.

La reacción de activación empleada en el proceso de inmovilización dependerá tanto del tipo de soporte o matriz sólida empleada, como del tipo de enzima a inmovilizar, a fin de no comprometer ningún residuo que forme parte de los centros activos. Por ello, un gran número de métodos se basan en la unión de los grupos hidroxilos superficiales del soporte, previamente activados, con grupos ε-NH₂ de lisinas de la proteína enzimática, para la formación de un enlace imínico, toda vez que estos restos no forman parte de los centros activos de las enzimas más habituales [252]. Así, soportes como la sílice, la alúmina o el cristal poroso, previamente funcionalizados con grupos amino por activación con γ-aminopropil-trietoxisilano (Figura 1.13), se han utilizado en la inmovilización de enzimas por sus excelentes propiedades mecánicas [253]. En muchos casos la introducción del grupo aldehído se efectúa uniendo glutaraldehído al soporte, previamente activado por silanización de los grupos hidroxilo superficiales [238,254].

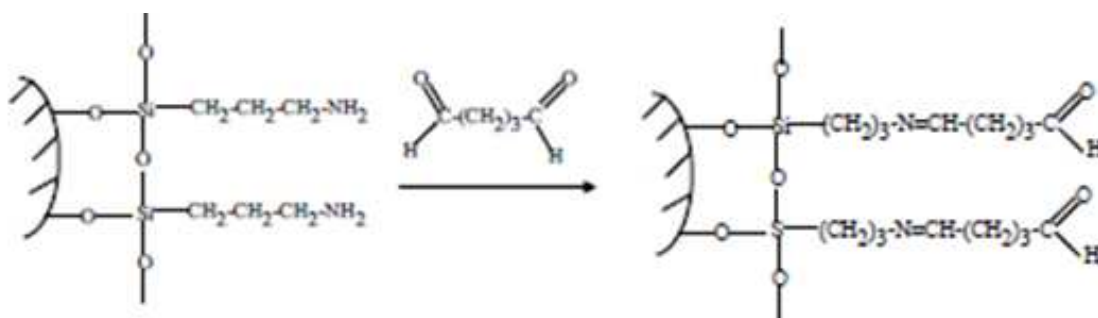
La tosilación se ha empleado en soportes como la agarosa, la sefarosa u otros polisacáridos, obteniéndose enzimas inmovilizadas que muestran mayor actividad que las libres [255], aunque las deficientes propiedades mecánicas de tales soportes dificultan el propio proceso de inmovilización [256].

No obstante, la utilización de grupos aldehídicos superficiales, para fijar enzimas mediante enlace covalente a los correspondientes soportes, es una de las técnicas más ampliamente descritas en la bibliografía [257]. Así, por ejemplo, una patente española [258], describe un método que emplea glicidol como activante, obteniéndose los grupos carbonilo a partir de la oxidación, con peryodato de los grupos hidroxilo vecinales formados [259], como se recoge en la Figura 1.14.

1. Silanización de un soporte inorgánico:



2. Activación del soporte silanizado con glutaraldehído:



3. Inmovilización covalente de la enzima, a través de un resto -NH₂ de lisina:

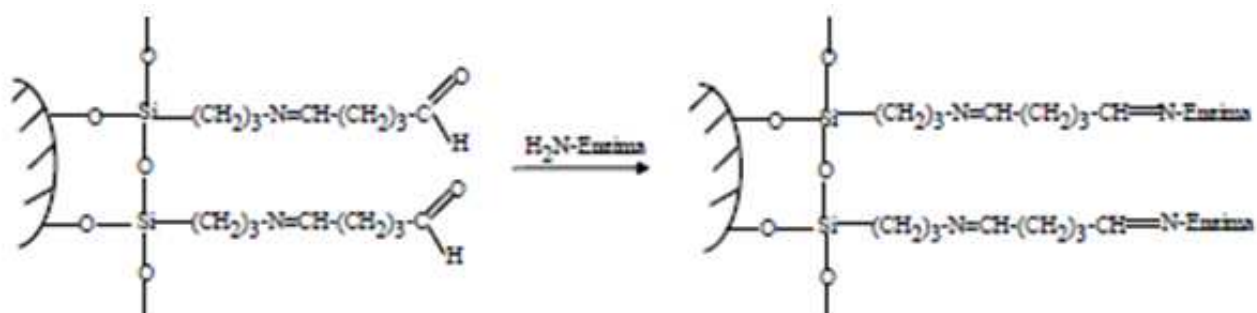


Figura 1.13. Inmovilización covalente de enzimas en soportes inorgánicos silanizados.

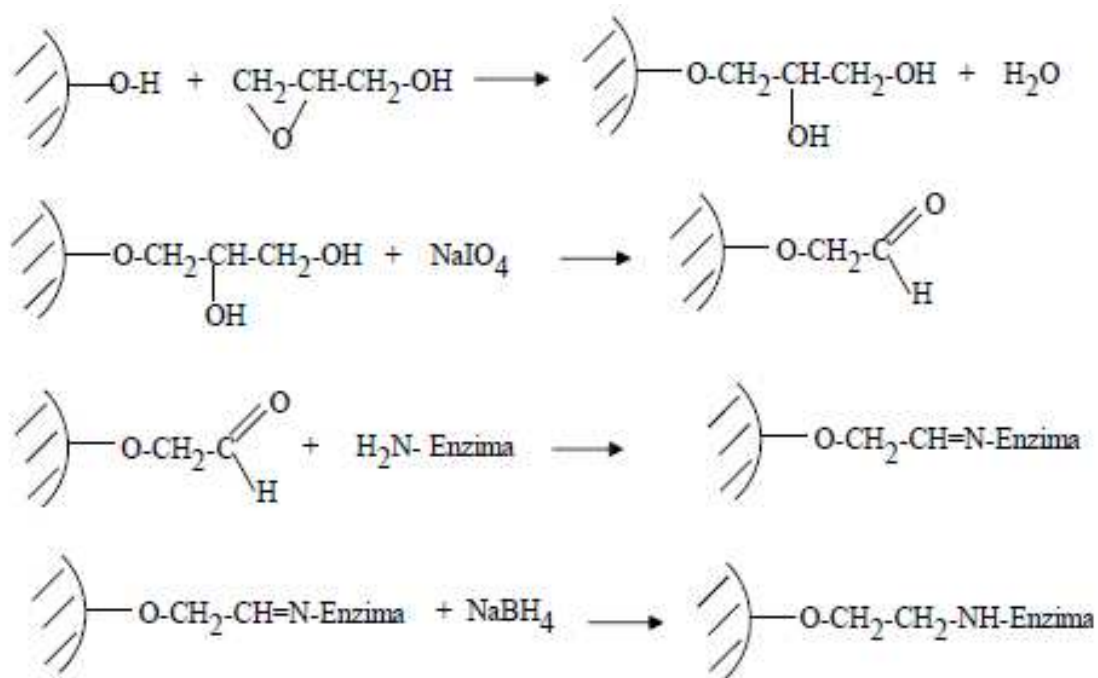


Figura 1.14. Activación de sólidos, por el método del glicidol, para la inmovilización covalente de enzimas.

En cualquier caso, todos estos métodos pasan por la formación de un enlace imínico entre un grupo aldehído alifático y los grupos ε-NH₂ de las lisinas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados que hemos publicado recientemente [260-262], la formación de dicho enlace imínico con un aldehído aromático, comparativamente mucho más estable, produce un aumento en la velocidad, fortaleza y estabilidad de la unión de la proteína al soporte. A esta eficiencia ciertamente también contribuye, en gran medida, la fortaleza de los enlaces fosfamido, entre los hidroxilos libres superficiales, de carácter ácido, del soporte y la 4-amino-bencilamina, que actúa como interfase en el híbrido orgánico-inorgánico obtenido en la superficie de los soportes activados (Figura 1.15).

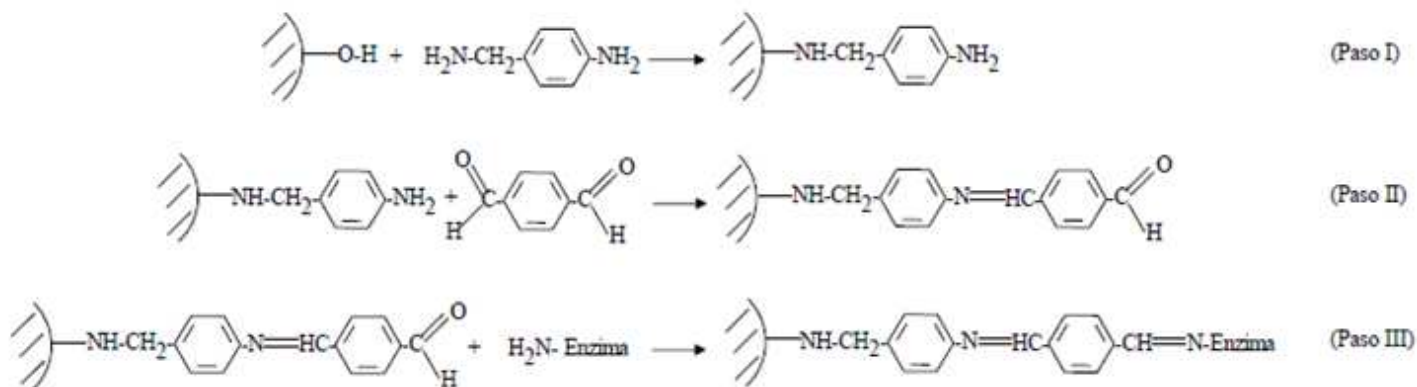


Figura 1.15. Esquema general de la inmovilización covalente de enzimas a través de grupos ϵ - NH_2 de las lisinas. Activación del soporte por reacción con 4-amino-bencilamina, (Paso I); post-modificación por reacción con el aldehído tereftálico (Paso II) y unión covalente de la enzima (Paso III).

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que este método, al ser aplicado con diferentes enzimas y procesos presenta las siguientes ventajas:

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.
- La carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización.
- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- La resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, es mayor al tener estabilizada su estructura terciaria.

No obstante, la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes, que hay que tener en cuenta a la hora de aplicar este procedimiento:

- Es necesario conocer la densidad de los grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

1.3.3.4. Efectos de la inmovilización

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar, se producen cambios en su estabilidad y en segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia la actividad enzimática se ve afectada por problemas de tipo difusional, estérico y de microentorno.

- *Efectos en la estabilidad*

La estabilidad de las enzimas, generalmente experimenta un incremento después de su inmovilización, debido sobre todo a que existen uniones multipuntuales enzima-soporte [263,264]. Así, la estructura terciaria de la enzima adquiere mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente. También se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

Por otro lado, existe una alteración del microentorno de la enzima debido a la interacción de la misma con el soporte [265]. En otros casos el soporte tiene un efecto tampón de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas, en presencia de disolventes orgánicos, la hidrofilia del soporte o su capacidad de retener agua, regula la actividad de la enzima.

Cuanto mayor es la hidrofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa [266]. La actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse tras su inmovilización. Si se pierde totalmente puede deberse a diversas razones: (i) la unión del soporte se produce de tal forma que impide el paso de sustrato al centro activo, (ii) los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forma parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima, (iii) se produce un cambio conformacional que da lugar a una forma

inactiva, y (iv) las condiciones experimentales del proceso de desnaturalización o desactivación de la enzima. Si la pérdida no es total, los cambios de actividad se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

1.3.3.5. Aplicaciones industriales de las enzimas

La aplicación de las enzimas en los procesos industriales está en pleno desarrollo, y forma parte de la Biotecnología actual. Desde hace siglos se usan enzimas en las industrias alimentarias clásicas. Homero describe, en una de sus obras, el proceso seguido por los griegos para la elaboración del queso, removiendo la leche con una rama de higuera, ignorando que esta rama liberaba una proteasa que provocaba la coagulación de la leche. En 1875, Christian Hansen desarrolló la primera industria de producción de enzimas, obteniendo una preparación enzimática estandarizada, compuesta por una mezcla de quimotripsina, también denominada renina, y pepsina.

Esta preparación se denominó cuajo y se utilizó en la preparación de los quesos. El desarrollo a gran escala de la industria de las enzimas se originó, en 1955, con la producción de la glucoamilasa, y tuvo su impulso definitivo con la utilización de las proteasas en la composición de los detergentes. A partir de ese momento, se iniciaron diversos frentes de investigación acerca de las enzimas y su utilización. Actualmente, el uso de enzimas en los procesos industriales está muy generalizado, encontrándose, tanto preparados parcialmente purificados, que pueden obtenerse a precios moderados, como puros, que alcanzan en algunos casos precios tan elevados que sólo permiten adquirir unos pocos miligramos, de ahí la importancia de lograr la inmovilización de las mismas [267].

En el caso de las enzimas inmovilizadas, las aplicaciones actuales más importantes se pueden clasificar en las siguientes:

1. Aplicaciones analíticas.

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en campos muy diversos como medicina, control de calidad de los alimentos y control medioambiental. En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. El biosensor contiene una molécula

biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que en contacto con el analito transformará la señal química en una señal eléctrica o de otro tipo. Posteriormente, dicha señal será amplificada y digitalizada. Los métodos de inmovilización más empleados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo [268].

2. Aplicaciones médicas.

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. El tratamiento con enzimas inmovilizadas, con efectos sustitutivos o terapéuticos, como son, una actividad antitumoral, o cicatrizante, entre otras muchas, permitiría una acción más prolongada y eficaz.

3. Aplicaciones en la industria farmacéutica.

La industria farmacéutica utiliza moléculas estructuralmente complejas y, en muchos casos, moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa real a la síntesis "por pasos", donde no convenga trabajar a temperaturas elevadas o se requiera una elevada especificidad de sustrato. Las enzimas son catalizadores quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida, que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.

4. Aplicaciones en la industria alimentaria.

El uso de enzimas en el procesado, preparación y conservación de alimentos, está muy extendido. Normalmente, las enzimas solubles añadidas son inactivadas por calentamiento una vez que el tratamiento ha concluido. En ocasiones se permite que continúe su actividad para que los alimentos desarrollen el aroma y la textura deseados, pero nunca se reutilizan. La inmovilización permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o discontinuas. Obviamente, existen limitaciones a su empleo relacionadas con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de alimentos [269].

5. Tratamiento de aguas residuales.

En la actualidad existe una gran posibilidad de utilización de enzimas inmovilizadas en la descontaminación de aguas residuales, ejemplos de ello son el desarrollo de un método para la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales que emplea enzimas inmovilizadas [270] ó la degradación de benceno (contaminante muy tóxico) mediante células de *Pseudomonas putida* atrapadas en geles de poliacrilamida [271].

6. Producción de biodiesel.

Las debilidades asociadas al procedimiento actual de producción de biodiesel, mediante catálisis homogénea en medio básico (el elevado consumo de agua de lavado, en el tratamiento posterior a la transesterificación de la mezcla de FAMEs que constituyen en el biodiesel, la obtención de glicerina de baja calidad, etc.), podrían ser superadas mediante la utilización de lipasas inmovilizadas y/o de relativamente bajo costo, ya que esto permitiría, no sólo la reutilización de las enzimas, sino que facilitaría también el procedimiento experimental para el aislamiento y purificación de los productos de la reacción.

Sin embargo, hasta el momento, a pesar de la gran cantidad de estrategias descritas en la bibliografía, el elevado precio de las lipasas y/o la ineficiencia de los métodos de inmovilización han hecho comercialmente inviable los intentos de aplicar a escala industrial el procedimiento enzimático (tanto en forma libre como fijadas por diversos métodos), y de ahí, la necesidad de conseguir mejoras importantes en estos procedimientos de inmovilización.

1.3.4. Estructura y mecanismo de acción de las lipasas

Las lipasas son enzimas lipolíticas activas cuando están adsorbidas sobre una interfase oleo-acuosa o en su defecto oleo-polar, fenómeno que recibe el nombre de “*activación interfacial*” [272]. Ésta es la diferencia fundamental con las esterasas, que catalizan el mismo tipo de reacciones, pero en medio acuoso. Por esta razón, la utilidad principal de las lipasas reside en la posibilidad de actuar sobre sustratos apolares, que solo son solubles en medios hidrófobos.

Las lipasas son una de las familias de enzimas más estudiadas y empleadas en los procesos industriales [273]. Además de las reacciones de hidrólisis que catalizan, en condiciones

de baja actividad de agua, son capaces de llevar a cabo reacciones no hidrolíticas: esterificaciones, transesterificaciones o interesterificaciones (Figura 1.16).

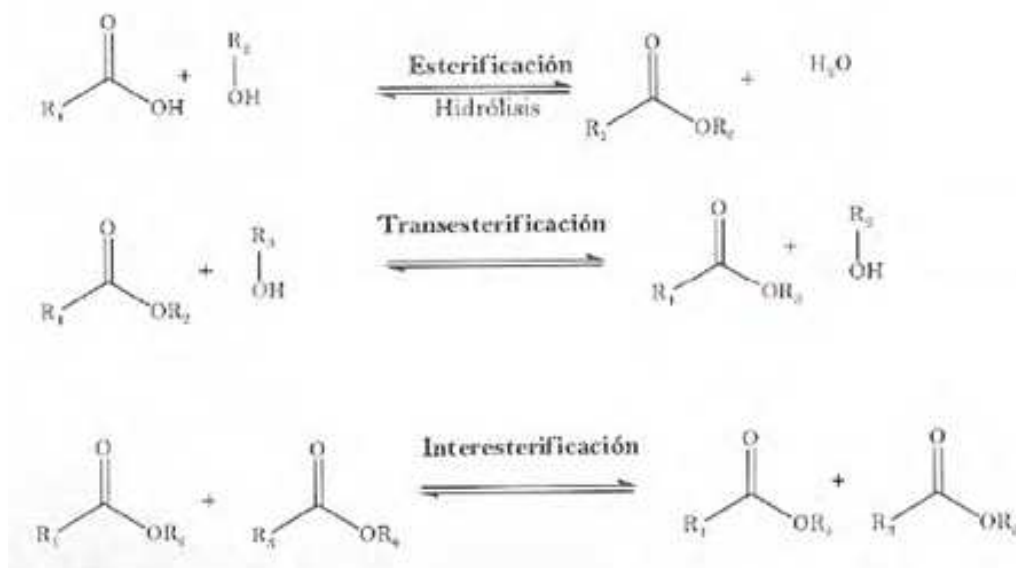


Figura 1.16. Reacciones catalizadas por las lipasas.

1.3.4.1. Activación interfacial

Durante décadas se ha discutido mucho acerca de las bases moleculares del fenómeno de la “activación interfacial” de las lipasas. Este fenómeno se produce gracias a la presencia de una “tapadera” (*lid*) en la estructura de la mayor parte de ellas. La tapadera se encuentra formada por un bucle o por una o dos hélices α , con naturaleza anfipática, que se dispone en la superficie de la enzima bloqueando el centro activo y evitando la entrada de los sustratos en su conformación “cerrada”. Cuando la enzima se encuentra en la interfase lípido-agua se produce un cambio conformacional que desplaza la tapadera a su conformación “abierta” (Figura 1.17). Este hecho provoca un aumento de la hidrofobicidad en la entrada al centro activo que favorece el acceso del sustrato al mismo, provocando un aumento significativo de la actividad conocido como activación interfacial. Sin embargo, existen lipasas que no manifiestan esta activación interfacial aunque posean tapadera, como por ejemplo las lipasas procedentes de *Candida antarctica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia glumae* [274].

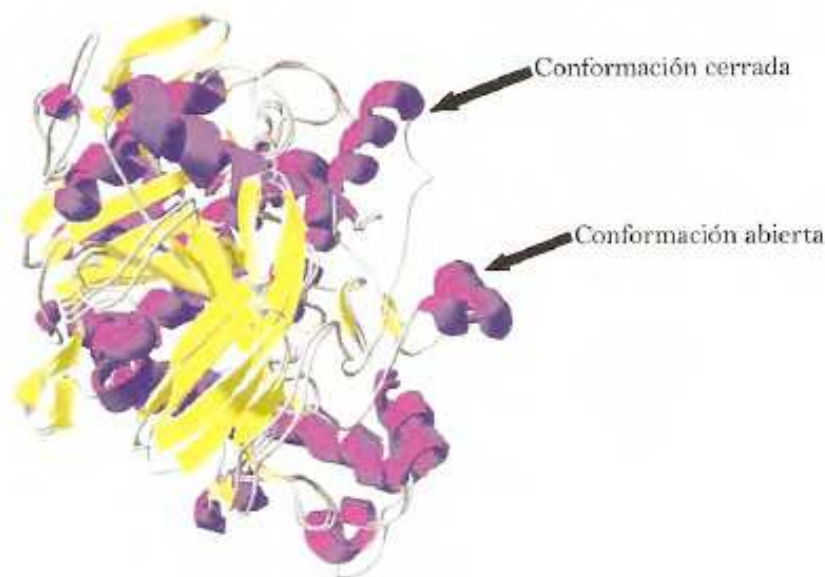


Figura 1.17. Estructura cristalina de la lipasa de *Candida rugosa* en sus conformaciones cerrada y abierta. Pueden verse en morado las hélices alfa y en amarillo las láminas beta.

Las lipasas, en general, presentan un plegamiento típico de las α/β hidrolasas, una estructura formada por 8 láminas β (generalmente dispuestas de forma paralela) interconectadas por hélices α . El centro activo de estas enzimas se encuentra formado por tres aminoácidos no continuos, denominados triada catalítica, cuya posición suele encontrarse conservada: una serina nucleófila, un ácido aspártico o glutámico y una histidina. La Ser catalítica se encuentra incluida en un pentapéptido, Gly(Ala)-X-Ser-X-Gly que se sitúa entre la lámina β_5 y la siguiente hélice α , cuya función es orientar y estabilizar la serina. Además de la triada catalítica, existen otros aminoácidos que intervienen en el proceso de catálisis estabilizando el intermedio de reacción mediante enlaces de hidrógeno y configurando la estructura conocida como "hueco oxianiónico" (*oxyanion hole*).

1.3.4.2. Mecanismos de reacción de las lipasas

El mecanismo de reacción de las lipasas se produce en cuatro etapas, durante las cuales existe un intercambio de cargas: (1) el ataque del grupo nucleófilo de la serina al enlace éster, formándose un intermedio tetraédrico entre el ácido graso y la serina; (2) la translocación de la carga negativa sobre el oxígeno de la serina al carbono carbonílico provoca la formación del oxianión; (3) la cesión de un protón de la histidina al alcohol, provocándose su liberación y la formación del complejo acil-enzima; y (4) el ataque de otro nucleófilo (H_2O o un compuesto

hidroxilado) sobre el carbono carbonílico causa la liberación del ácido graso y la recuperación del centro activo (Figura 1.18).

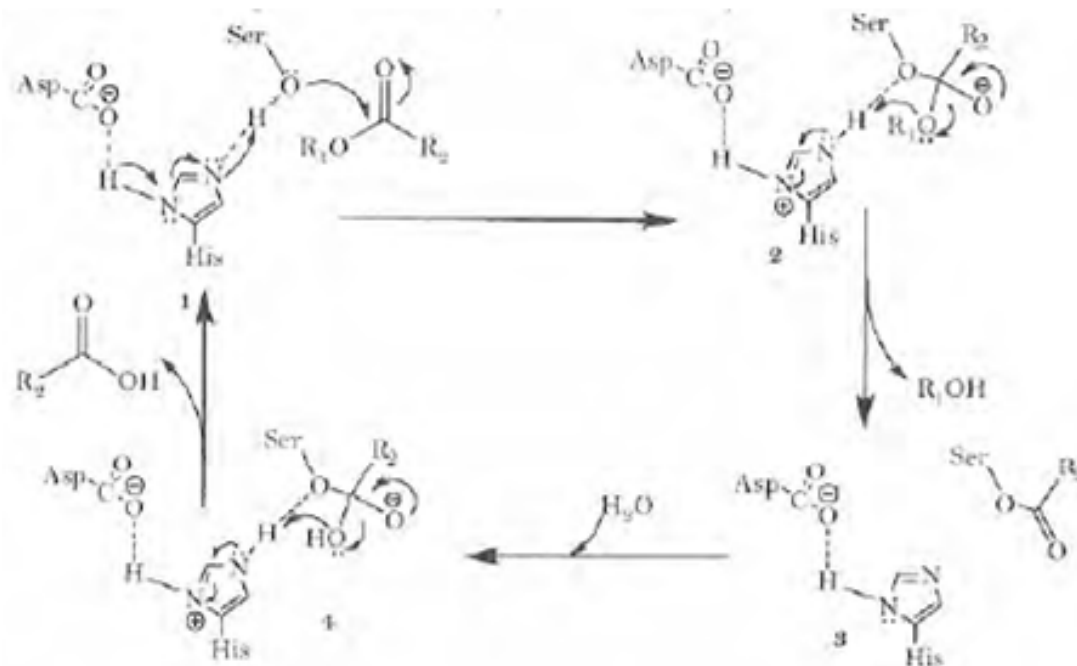


Figura 1.18. Mecanismo de reacción genérico de las lipasas.

Entre las aplicaciones en la industria alimentaria, que es uno de los mayores campos de utilización, destacan la obtención de lípidos estructurados [275], la interesterificación de grasas para la obtención de margarinas, la maduración de quesos y la obtención de aromas [276].

El problema del uso de las lipasas en los procesos sintéticos es la necesidad de utilizar disolventes orgánicos, en los cuales estas enzimas no son solubles y además se inactivan. Para solventarlo se han desarrollado, tanto métodos de inmovilización de enzimas, como métodos de utilización de las lipasas en sistemas sin disolvente (*solvent free system*), cuando el proceso lo permite, como es el caso de la producción de biodiesel [277-280].

1.3.5. Efecto del agua en la actividad catalítica

El medio biológico de actuación de las enzimas es el agua, ya que participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes (interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals) [281], que permiten el mantenimiento de la conformación nativa, y por tanto, catalíticamente activa de las enzimas [282,283]. Además, se ha

comprobado que aunque las enzimas mantienen perfectamente su actividad y conformación en un medio orgánico, se pueden inactivar si se elimina toda el agua del medio, ya que el disolvente orgánico captará moléculas de agua de la enzima. Por tanto, la cuestión que hay que plantearse no es si las enzimas necesitan agua, sino cuánta agua necesitan para mantener su conformación activa en un determinado medio de reacción.

Además, las transesterificaciones de aceites y grasas, son reacciones en las que el contenido de agua en el medio de reacción es un parámetro esencial, ya que la presencia de agua puede favorecer la hidrólisis tanto de los reactivos como de los productos de reacción (ésteres), además de aportar un microentorno de hidratación adecuado para que la enzima conserve su forma activa. Debido a esto, es importante evaluar la influencia del contenido de agua del medio de reacción en el progreso de la reacción.

En este trabajo se pretende aplicar una metodología enzimática para la obtención de biocombustibles que integran la glicerina como monoglicérido, mediante el empleo de catálisis heterogénea, aplicando la lipasa *Rhizomucor Miehei* inmovilizada, a fin de evaluarla la diferencia obtenida en su comportamiento tras su inmovilización en soportes inorgánicos, en la reacción de transesterificación de aceite de girasol para la obtención del combustible denominado "Ecodiesel". Además es de interés evaluar la diferencia de comportamiento observada entre la lipasa inmovilizada en este estudio, sobre soportes inorgánicos, y lipasa *Rhizomucor Miehei* inmovilizada comercial, sobre soportes poliméricos.

1.4. Catalizadores básicos heterogéneos

La utilización de un catalizador heterogéneo adecuado puede eliminar algunas de las desventajas económicas y ambientales de un proceso homogéneo, simplificando los procesos de producción y de purificación. El uso de catalizadores heterogéneos presenta las siguientes ventajas:

- El catalizador puede ser reutilizado, ya que no se consume en el proceso de producción, mientras que en el caso de catálisis homogénea, dados los problemas de separación, es necesario utilizar catalizador nuevo para cada producción.

- El catalizador heterogéneo se separa rápidamente de la mezcla de reacción por filtración, por lo que se facilita la purificación del biodiesel y la glicerina, y se evita el consumo de grandes volúmenes de agua.

- Como consecuencia de lo anterior, al no tener que procesar el agua de lavado, se evita el lanzamiento de efluentes al medio ambiente y también se simplifica el equipo necesario para llevar a cabo el proceso [284-287].

Los catalizadores heterogéneos, al igual que los homogéneos pueden tener carácter ácido o básico. La ventaja de utilizar los catalizadores heterogéneos ácidos radica en que son capaces de esterificar los ácidos grasos de un aceite con un gran rendimiento y, además, son indiferentes a la presencia de ácidos grasos libres

Generalmente, los catalizadores ácidos exhiben actividades catalíticas débiles, ya que necesitan tiempos de reacción muy elevados y, además, requieren generalmente altas temperaturas de reacción [285].

Por otra parte, los catalizadores básicos exhiben altas actividades catalíticas y tienen las ventajas de ser anticorrosivos, ambientalmente benignos y presentar menos problemas de eliminación. Además, son fácilmente separables de los productos líquidos y se pueden modificar para dar mayor actividad, selectividad y vida al catalizador [286].

También hay que tener en cuenta, como principal inconveniente de los catalizadores heterogéneos, la posibilidad de la lixiviación, solubilizándose en parte, y actuando como catalizador en fase homogénea. Para comprobar este extremo se realizan dos experimentos. En el primero de ellos se pone en contacto la cantidad de catalizador utilizada en una reacción con el metanol que se utilizaría para dicha reacción. Este contacto se debe llevar a cabo a la temperatura propia de la reacción de transesterificación y durante un tiempo igual al de la reacción. Una vez transcurrido el tiempo definido se filtra el metanol y se utiliza para llevar a cabo una reacción. En esta segunda reacción no se añade catalizador, comprobando de esta manera la existencia de lixiviación, ya que el único catalizador presente sería el que se haya podido lixiviar, tras el contacto del sólido con metanol.

Un gran número de reacciones químicas se han explicado en términos de interacciones ácido-base. En las reacciones catalizadas por ácidos, los reactivos actúan como bases frente a los catalizadores que actúan como ácidos, al contrario de lo que ocurre en las reacciones catalizadas por bases.

En sistemas homogéneos se conocen un gran número de reacciones que son catalizadas tanto por ácidos como por bases, pero en sistemas heterogéneos el número es más reducido. En particular, la catálisis ácida heterogénea se ha estudiado más que la catálisis básica heterogénea debido a su importancia industrial, empleándose en distintos procesos relacionados con la industria del petróleo [288].

Muchas moléculas orgánicas pueden reaccionar a través de carbaniones formados por pérdida de un protón sobre catalizadores básicos. La reactividad de los carbaniones, en contraste con los carbocationes formados en centros ácidos, puede controlarse mejor, con lo que la selectividad puede aumentar respecto a unos productos determinados.

En el primer estudio de catalizadores básicos heterogéneos se encontró que el sodio metálico dispersado sobre alúmina actuaba como un efectivo catalizador en la migración del doble enlace en los alquenos [289]. Considerando la fuerte tendencia del sodio a donar electrones, parece natural que este sodio metálico dispersado sobre alúmina actuara como catalizador básico heterogéneo.

En los años setenta algunos estudios demostraron que las moléculas de hidrógeno eran adsorbidas en óxido de zinc mediante interacciones ácido-base para formar un protón y un hidruro [290,291]. En la misma época, también se informó acerca de que los óxidos de calcio y magnesio tenían una elevada actividad en la isomerización de 1-buteno si el catalizador se trataba a elevada temperatura y en condiciones de alto vacío [292].

En la actualidad, debido al aumento de las restricciones medioambientales se hace más difícil el uso de los clásicos métodos estequiométricos con catalizadores homogéneos (hidróxido sódico, potásico, metóxido sódico, etc.) que generan gran cantidad de efluentes contaminados. El uso de catalizadores heterogéneos puede disminuir la generación de estos contaminantes, aumentando los beneficios económicos y ecológicos. Estas ventajas medioambientales hacen que su estudio se encuentre en pleno desarrollo.

Las propiedades catalíticas de los catalizadores básicos heterogéneos están relacionadas fundamentalmente con la cantidad y fuerza de los centros básicos sobre la superficie de los mismos.

Existen cuatro tipos de características que permiten aplicar ciertos materiales inorgánicos como catalizadores básicos heterogéneos [288]:

- La caracterización de su superficie indica la existencia de centros básicos.
- Hay una relación paralela entre la actividad catalítica y la cantidad y/o fuerza de los centros básicos superficiales. Los centros activos básicos pueden ser envenenados por moléculas ácidas como el CO₂.
- Poseer una actividad similar a la que presentan los catalizadores básicos homogéneos (obtención de los mismos productos y mecanismos de reacción esencialmente iguales).
- Se encuentran indicios de la participación de intermedios aniónicos en las reacciones. Así, los estudios sobre los mecanismos de las reacciones, de la distribución de productos y las observaciones espectroscópicas de las especies adsorbidas indican que en estas reacciones están implicados intermedios aniónicos:

Existen una serie de materiales considerados comúnmente como catalizadores básicos heterogéneos:

Óxidos metálicos.

Los óxidos de metales alcalinotérreos (MgO, CaO, SrO y BaO) presentan centros básicos fuertes. Sus superficies deben ser tratadas previamente para activar los centros básicos, ya que en condiciones normales se encuentran carbonatadas o hidratadas. El envenenamiento de este tipo de catalizadores puede producirse incluso con pequeñas cantidades de agua (H₂O) y de dióxido de carbono (CO₂) que se encuentren como impurezas en los reactivos. Para obtener el máximo rendimiento no deben existir impurezas, lo que impide su uso como catalizador a escala industrial, especialmente a bajas temperaturas. A altas temperaturas el envenenamiento deja de tener cierta importancia debido a la eliminación del agua y a la descomposición de los carbonatos.

Los óxidos de tierras raras se han estudiado en menor medida. Aún así, se han descrito diversas reacciones sobre estos catalizadores, como por ejemplo la hidrogenación de olefinas, la migración del doble enlace en olefinas, la condensación aldólica con cetonas y la deshidratación de alcoholes [293].

Algunos materiales como el óxido de circonio (ZrO₂), no sólo presentan propiedades básicas, sino que bajo ciertas condiciones y dependiendo del reactivo se comportan como ácidos. Esta bifuncionalidad se pone de manifiesto en la reacción de aminas secundarias y terciarias sobre ZrO₂ para producir nitrilos, en la que es necesaria la presencia tanto de un catalizador ácido como la de uno básico [294].

Otras especies

Aunque la mayoría de los catalizadores básicos se presentan como óxidos, siendo los centros básicos los átomos de oxígeno con un par de electrones libres (O²⁻), pueden existir centros básicos constituidos por elementos de distinta naturaleza en los que su reactividad debe ser diferente.

Así, el fluoruro potásico soportado sobre alúmina ($\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$) además de ser un agente en reacciones de fluoración, presenta actividad catalítica básica en reacciones como la adición de Michael [295], reacción de Witting-Horner [296], condensación de Darzen, condensación de fenilacetileno con benzaldehído [297], etc.

La basicidad de este catalizador se atribuyó en primer lugar a especies reactivas de flúor (F^-) distribuidas en la red de alúmina, mientras que posteriores estudios demostraron que la especie reactiva era el ion hidróxido (OH^-), originado por hidróxido potásico (KOH) y aluminatos producidos en la superficie de la partícula [298]. Se puede considerar de forma general que existen tres especies responsables de la basicidad de estos catalizadores:

- Los iones fluoruro dispersos en la estructura.
- Especies Al-O^- generadores de iones OH^- en presencia de agua.
- Coordinación de F^- con Al-OH que puede actuar como centro básico y se genera "in situ" en la reacción.

Catalizadores superbásicos

En condiciones de operación suaves es necesaria la presencia de centros fuertemente básicos para activar ciertos reactivos. Son varios los autores que han intentado sintetizar catalizadores con una gran basicidad.

Mediante la adición de hidróxidos alcalinos sobre alúmina calcinada y posterior adición de metales alcalinos, se consiguió un sólido con buenas propiedades como catalizador básico [299]. El pK_a de este material es de 37 con lo que es capaz de eliminar protones de carbonos terciarios en alquilbencenos, paso previo para su alquilación.

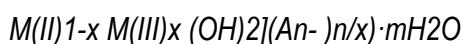
Se puede preparar un catalizador de este tipo añadiendo sodio en forma de nitrato sódico (NaNO_3) sobre óxido de magnesio (MgO) tratado térmicamente a alta temperatura. El resultado es un catalizador eficaz para la descomposición de formiato de metilo para dar monóxido de carbono y metanol [299].

Arcillas aniónicas

De entre estos materiales destacan las hidrotalcitas. La hidrotalcita, $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}](\text{CO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, se incluye dentro del grupo de compuestos denominados arcillas aniónicas. La estructura de la hidrotalcita es similar a la estructura de la brucita, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, en la cual el magnesio se encuentra coordinado octaédricamente a seis grupos hidroxilo. Estos octaedros, comparten sus caras formando láminas bidimensionales y cuando el Mg^{2+} es reemplazado por Al^{3+} el conjunto adquiere una carga residual positiva y se denomina hidrotalcita. Para compensar esta carga positiva se requiere un anión que generalmente reside en la zona interlaminar, junto con moléculas de agua [300]. El anión interlaminar puede ser intercambiado por otros aniones en medio acuoso u orgánico, como CO_3^{2-} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , $-\text{COO}-$, heteropolianiones, etc., incluso se pueden intercalar grandes aniones que son activos catalíticamente para la epoxidación de alquenos, tales como $\text{V}_{10}\text{O}_2^{86-}$, $\text{Mo}_7\text{O}_2^{46-}$ y $\text{W}_{12}\text{O}_4^{16-}$ [301].

En consecuencia, la hidrotalcita constituye un buen precursor para formar óxidos mixtos binarios (y probablemente hasta terciarios) en donde se busca la mezcla homogénea de los componentes. La temperatura de calcinación tiene un efecto muy importante sobre estos materiales y provoca diversos cambios en sus propiedades físico-químicas.

Existe una gran variedad de materiales tipo hidrotalcita que se pueden preparar y la formula general que los representa es:



Según la bibliografía únicamente se pueden obtener compuestos tipo hidrotalcita cuando $0.2 < x < 0.33$, ya que para valores de x diferentes de este intervalo se forman los hidróxidos u óxidos libres del catión en exceso, mezclados con la hidrotalcita.

Estos materiales presentan características básicas, superiores incluso a las del óxido de magnesio, y se han utilizado en distintas reacciones como condensaciones de Knoevenagel, de Michael, y de Claisen-Schmidt, isomerización de olefinas, condensaciones aldólicas, epoxidación de olefinas, etc.

En este trabajo se pretende evaluar la aplicación de catálisis básica heterogénea para la obtención de biocombustibles que integran la glicerina como monoglicérido, mediante el empleo de, sistemas KF soportados en ZnO, MgO y Al₂O₃, o CaO puro, finamente pulverizado. Estos sólidos catafíticos presentan un carácter básico más débil que los convencionales homogéneos a base de metales alcalinos, Na o K, pero esto puede constituir una fortaleza, a la hora de conseguir un proceso de transesterificación selectiva, capaz de discriminar los ésteres de alcoholes primarios (posiciones 1 y 3 del glicerol), respecto a los secundarios (posición 2).

Es decir, se trata de conseguir la síntesis de Ecodiesel mediante la aplicación de un catalizador heterogéneo menos activo que los metales alcalinos, evaluando la viabilidad de estos catalizadores heterogéneos en función de su capacidad de reutilización.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Este capítulo se puede dividir en tres apartados:

En primer lugar se detallan las metodologías seguidas para la realización de todos los ensayos llevados a cabo. Se describe el método cromatográfico utilizado, para la determinación de las concentraciones de los diferentes componentes de las reacciones estudiadas.

En segundo lugar, se trata la síntesis, funcionalización, activación y caracterización superficial de los soportes utilizados en la inmovilización tanto de la lipasa *Rhizomucor miehei*, como del sistema KF soportado en diferentes sólidos inorgánicos (ZnO, MgO y Al₂O₃) y la preparación del CaO para su utilización.

Por último, se describe el diseño experimental utilizado en la mayoría de los estudios, así como los modelos utilizados para relacionar las variables dependientes con las independientes y evaluar qué variables son las más influyentes para su optimización.

2.1. Métodos de análisis

En este apartado se hace referencia al procedimiento de preparación de las muestras. También se trata la caracterización de los productos de la reacción, mencionaremos todas las propiedades marcadas por la normativa ENE 14214 para biodiesel [302-315], y nos centraremos en como calculamos los parámetros más influyentes en el buen funcionamiento del biocombustible en el motor. Se estudian con detalle el cálculo de la viscosidad cinemática y la determinación de los contenidos de los compuestos presentes en las muestras de biodiesel (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y glicerol libre), basándonos en la conversión y selectividad.

Es importante destacar la determinación de la viscosidad cinemática de las muestras de biocombustibles, al ser el parámetro que permite que el combustible sea utilizable en motores, ya que están diseñados para operar con combustibles con un rango concreto de viscosidades cinemáticas, entre 2 y 4.5 cSt en Europa (en USA 2-6 cSt). Si se utilizan biocombustibles con viscosidad elevada se producen pérdidas de potencia y una mala combustión, mientras que si la viscosidad es demasiado baja se genera una mezcla demasiado rica en combustible (y pobre en oxígeno) y la combustión es deficiente.

Determinación de las propiedades químico-físicas de los biocombustibles

Las propiedades físicas y químicas de los biocombustibles están relacionadas con la composición de las materias primas, pudiendo variar sustancialmente de una materia prima a otra, es decir, del aceite vegetal utilizado.

Para producir biodiesel existen varias materias primas que contienen los triglicéridos que se necesitan para obtener los ésteres alquílicos. Las principales materias primas usadas son los aceites vegetales convencionales: colza, girasol, soja, palma y coco.

En este estudio nos centraremos en el uso del aceite de girasol, ya que es la materia prima más abundante en nuestro país, aunque hemos realizado mezclas con distintos aceites para probar en que porcentaje pueden ser mezclados con diesel, manteniendo un correcto uso del motor.

Densidad

La densidad es una de las propiedades más importantes de los combustibles, ya que los sistemas de inyección, bombas e inyectores deben suministrar la cantidad de combustible con precisión para proporcionar la combustión adecuada [302].

La densidad del biodiesel depende del contenido en ésteres y de la cantidad remanente de alcohol, por lo tanto, esta propiedad viene determinada fundamentalmente por el aceite vegetal elegido y, en cierta medida, por las etapas de purificación aplicadas [303].

Se determina la masa de la unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico, a una temperatura dada. La temperatura requiere un estricto control, ya que la densidad de las materias grasas varía aproximadamente 0.00068 unidades por grado. La determinación se realizará con un picnómetro normal de 10 ml, a 25 °C de temperatura, mediante el cociente del peso del aceite por 10, obteniéndose así la densidad, d , en g/ml.

Humedad

En el proceso de obtención del biodiesel, comúnmente se emplea agua en la etapa de lavado. Posteriormente, el agua es eliminada, pero puede quedar un contenido de humedad residual que va a variar en función del método escogido para su secado, según la eficiencia del mismo. A escala industrial, la deshidratación se realiza normalmente mediante destilación en vacío (5 kPa) a temperaturas de 30 a 40 °C, lo que lleva a la disminución pronunciada del contenido de agua [304].

Se sabe que los ésteres metílicos son más higroscópicos que los combustibles a base de petróleo y, durante el almacenamiento, pueden absorber más agua hasta alcanza una concentración de aproximadamente 1000 ppm. Si se sobrepasa esta cantidad, puede tener lugar la acumulación de la misma en el fondo de los tanques de almacenamiento. La presencia de agua libre promueve el crecimiento de microorganismos que degradan el biodiesel, reduciendo su capacidad de almacenamiento. También puede afectar al funcionamiento del motor puesto que los lodos producidos pueden causar obstrucción de los filtros y las líneas por las que circula el combustible [305].

El biocombustible contaminado con agua puede causar la corrosión del motor o reaccionar con glicéridos para producir jabones y glicerina.

Se han determinado mediante un ensayo por el cual la muestra se calienta en una estufa a vacío hasta que la pesada es constante. Para ello, se tara un vaso de precipitado, bien seco; se anota su peso y se añaden entre 35 - 45 g de muestra. Se introduce en un dispositivo que permite calentar a vacío, manteniendo una temperatura constante a 100 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo y una vez frío, se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener una pesada constante. El contenido en humedad se obtiene de la diferencia de pesos y se expresa en tanto por ciento.

Índice de acidez

La determinación del índice o grado de acidez [310] es una medida del contenido de ácidos grasos libres en el material de partida. Dicha medida es de gran importancia en la producción de biodiesel convencional, ya que el procedimiento de catálisis básica utilizado hace que en presencia de ácidos libres se produzca la desactivación del catalizador y la formación de jabones. El índice hace referencia al peso en mg de KOH empleado para neutralizar los ácidos grasos presentes en un gramo de muestra. El grado hace referencia al porcentaje en peso de estos ácidos grasos libres.

Para determinar el grado de acidez se ha seguido el procedimiento descrito en la norma ISO 660. Para ello se pesan entre 2.5 - 10 g de muestra, dependiendo de la acidez esperada, y se disuelven en 50 - 150 ml de una solución (1:1 v/v) de etanol-éter etílico (Panreac), previamente neutralizada. Se lleva a cabo una volumetría valorando con una disolución de KOH 0.1 N, previamente estandarizada, (Licor acidimétrico valorado, Panreac) y la adición de unas gotas de una solución de 10 g/L de fenolftaleína en etanol, hasta el cambio de color violeta que indica el punto final de la valoración. La acidez se expresa como porcentaje en ácido oleico.

Determinación del contenido de FAMEs, FAEEs y glicéridos en los productos de reacción mediante cromatografía de gases.

A) Cuantificación de los ésteres alquílicos y glicerina

La cuantificación de los ésteres metílicos o etílicos, así como de las cantidades de monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG) contenidos en la mezcla de reacción, se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases Varian 430 GC Gas Chromatograph (Figura 2.1) conectado a una columna capilar HT5, 0.1 μ m (25 m x 0.32 mm, SGE) Aldrich Chemie, siguiendo el método oficial de análisis de ésteres, mono, di, triglicéridos y glicerina UNE EN 14103 (ésteres) y UNE EN14105 (glicéridos), usando 12,5 μ l de la reacción, disuelto en 4 mL de una mezcla formada por 200 mL de etanol, 200 mL de diclorometano y 1 g de cetano (hexadecano). Se basa en el empleo de una rampa de calentamiento que se inicia a 45 °C (para comprobar la posible existencia de glicerina) hasta 200°C, a una velocidad de 5°C/min, manteniendo los 200 °C durante 10 minutos, y seguida de otra rampa hasta los 350 °C a una velocidad de 10 °C/min, resumidos en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Programación de la temperatura del horno utilizada para analizar FAME.

Fases	FAME
Temperatura inicial	45 °C
Rampa 1	5 °C/min hasta 200 °C
Mantener	10 min a 200 °C
Rampa 2	10 °C/min hasta 350 °C
Mantener	10 min a 350 °C
Tiempo total (min)	66 min



Figura 2.1. Cromatógrafo Varian 430 GC Gas Chromatograph, utilizado para el análisis de la composición del biocombustible.

B) Determinación de la selectividad

Podemos definir la selectividad como la coincidencia en los picos de la franja cromatográfica entre el cromatograma del petrodiesel y el cromatograma del biocombustible. Como se puede observar en la Figura 2.2, en negro el petrodiesel y en rojo el biocombustible, consideramos como selectividad todos los compuestos cuyos picos aparecen con valores de tiempos de retención (RT) hasta el minuto 25, ya que en este intervalo aparecen los diferentes hidrocarburos que forman el diesel. Es decir, la selectividad indica el conjunto de ésteres metílicos de los ácidos grasos de nuestro aceite de partida que aparecen en la misma zona. La posesión de valores similares de RT indica la posesión de propiedades químico-físicas similares entre los hidrocarburos y los FAMEs y/o MGs. Los productos de reacción con RT superiores a 25 minutos corresponden a algunos MGs y DGs, que presentarán propiedades más alejadas de los valores de viscosidad de los hidrocarburos o FAMEs de menores valores de RT. La variación entre los diferentes aceites viene determinada por el diferente perfil de ácidos grasos de cada

aceite o grasa. En concreto en el aceite de girasol los más representativos en porcentaje son 63,5% linoleico, 24% oleico, 6,5% palmítico, 5% esteárico y un 2% de palmitoleico, linolénico, behénico y cetoleico en distintos porcentajes.

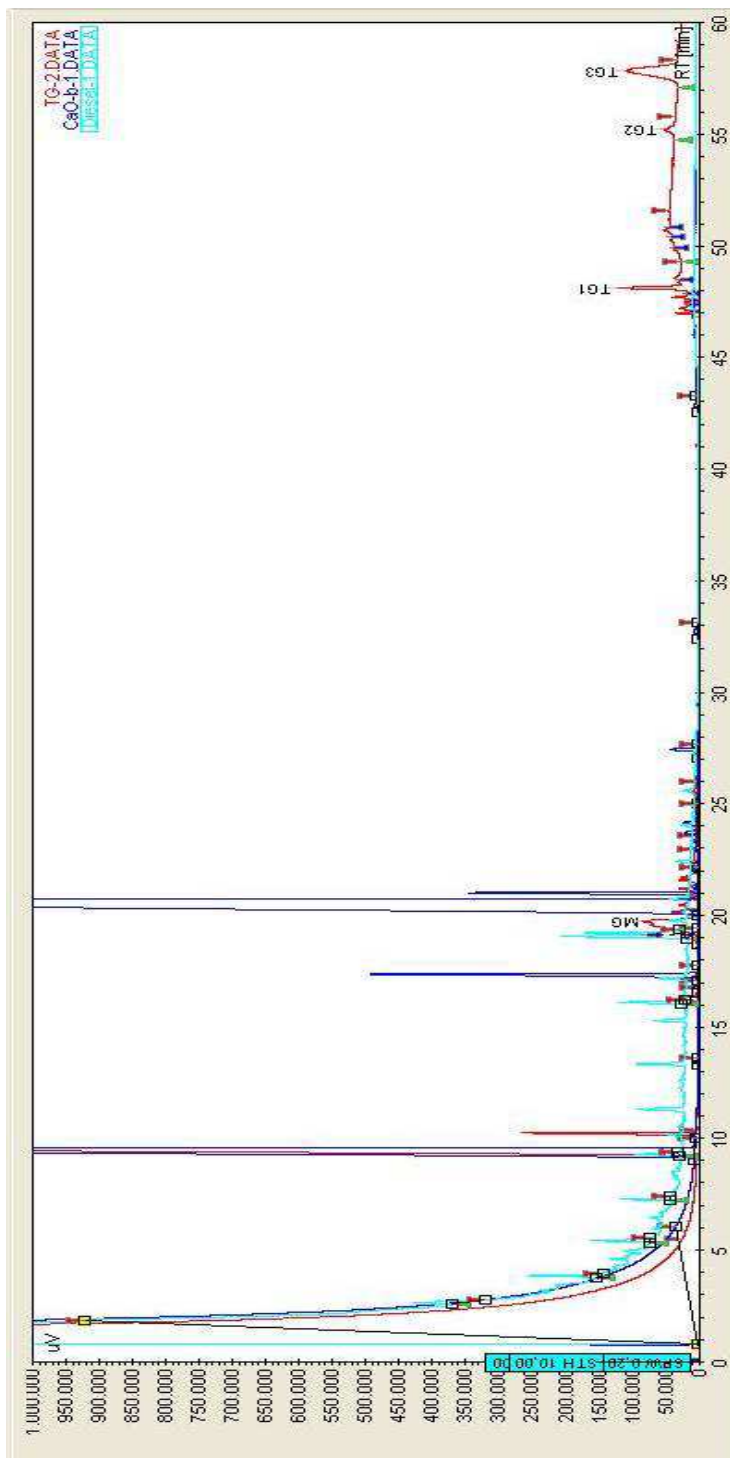


Figura 2.2. Cromatograma del petrodiesel (azul), el aceite de girasol (rojo) y el biocombustible (malva), que identifican la selectividad, como los productos de reacción con tiempos de retención análogos al diesel.

Determinación de la viscosidad

Dado que las propiedades físico-químicas de los aceites y sus correspondientes FAEE o FAME son muy similares, siendo la viscosidad el parámetro esencial a modificar, para poder aplicarlo como combustible en los actuales motores Diesel, tenemos que su correcta determinación es crítica para evaluar la calidad del biocombustible obtenido, ya que valores inadecuados de este parámetro pueden afectar decisivamente el correcto funcionamiento del motor.

Para las medidas de viscosidad se sigue el procedimiento descrito en la Norma Española UNE 55-105-73. En esta memoria nos referimos a la viscosidad cinemática, entendiéndose por viscosidad la resistencia que ofrecen las capas de una masa líquida para el desplazamiento paralelo de unas sobre otras. La viscosidad dinámica, η , es la fuerza necesaria, expresada en dinas para que dos láminas del líquido, con una superficie de 1 cm^2 y separadas entre sí 1 cm , se desplacen paralelamente, a la velocidad de 1 cm/s . Su unidad es el Poise, P, cuyas unidades son $\text{g/cm}\cdot\text{s}$. Se emplea como submúltiplo el centipoise, cP. Así, la viscosidad cinemática, u , representa el cociente entre la viscosidad dinámica y la densidad (ρ), $u = \eta/\rho$. Su unidad es el Stoke, St, cuyas unidades son mm^2/s , ya que $[\text{g/cm}\cdot\text{s}]/\rho$ supone $[\text{g/cm}\cdot\text{s}]/[\text{g/cm}^3]$, es decir, cm^2/s . Se emplea como submúltiplo el centistoke, cSt, mm^2/s .

La determinación de la viscosidad en un viscosímetro capilar de Ostwald Proton Cannon-Fenske Routine Viscometer 33150, size 150, se basa en determinar el tiempo necesario para que un determinado volumen de líquido pase entre dos puntos marcados en el instrumento (líneas de referencia), colocado en posición vertical, Figura 2.3. Esto constituye una medida de la amortiguación que sufre el flujo del líquido, como consecuencia del frotamiento interno de sus moléculas, función de su viscosidad, siempre que se mantengan constantes las variables que influyen en el proceso, principalmente la temperatura. A partir del tiempo de flujo, t , expresado en segundos, se obtiene la viscosidad cinemática expresada en centistokes, $u = C\cdot t$, siendo C, la constante de calibración del sistema de medida en $\text{cSt}\cdot\text{s}$, que viene dada por el fabricante del aparato, siendo en este caso $0.04058 \text{ mm}^2/\text{s}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ y t el tiempo de flujo en segundos.

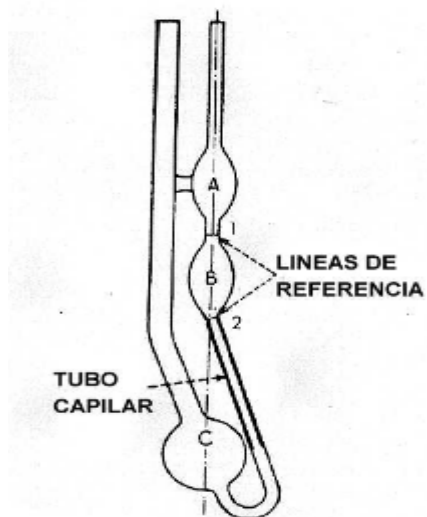


Figura 2.3. Viscosímetro de Ostwald Proton Cannon-Fenske.

2.2. Materia prima utilizada

2.2.1. Aceite de girasol

Para la reacción de transesterificación parcial se ha utilizado aceite de girasol comercial marca “Aliada”. Este aceite de girasol tiene una viscosidad de partida de 32.0 cSt, que realizando una reacción de biodiesel convencional (según normativa EN 14214), se reduce hasta 3.5-4 cSt y la reacciones de transesterificación parcial realizadas en este trabajo experimental se reduce hasta 8-20 cSt, suficiente para el objetivo principal de esta tesis que es la mezcla de este biocombustible (en diferentes porcentajes) con el diesel fósil.

El aceite de girasol es una fuente importante de ácidos grasos insaturados de cadena larga, sobre todo aquellos que son esenciales como el ácido linoleico y ácido linolénico. Los aceites vegetales debido a la presencia de dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, son sensibles a la oxidación. La composición total de ácidos grasos del aceite de girasol se recoge en la siguiente Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Composición de ácidos grasos de un aceite de girasol.

	Girasol
C8(n)/caprílico	0
C10(n)/cáprico	0
C12(n)/láurico	0
C14(n)/mirístico	0
C16(n)/palmítico	6,5
C16(=)/palmitoleico	0,25
C18(n)/esteárico	5
C18(=)/oleico	24
C18(2=)/linoleico	63,5
C18(3=)/linolénico	0,35
C20(n)/araquídico	0
C20(=)/gadoleico	0
C22(n)/behénico	0,5
C22(=)/cetoleico	1,5
C24(n)/lignocérico	0
Índice de Yodo	127

Cromatográficamente estos ácidos grasos no son detectados por el integrador como picos, sino que se amontonan al final de la rampa de temperatura como se muestra en la siguiente Figura 2.4. Para que estos ácidos sean detectados por el integrador, tras realizar la reacción de transesterificación del aceite de girasol, se detectarán los ésteres metílicos de estos ácidos grasos.

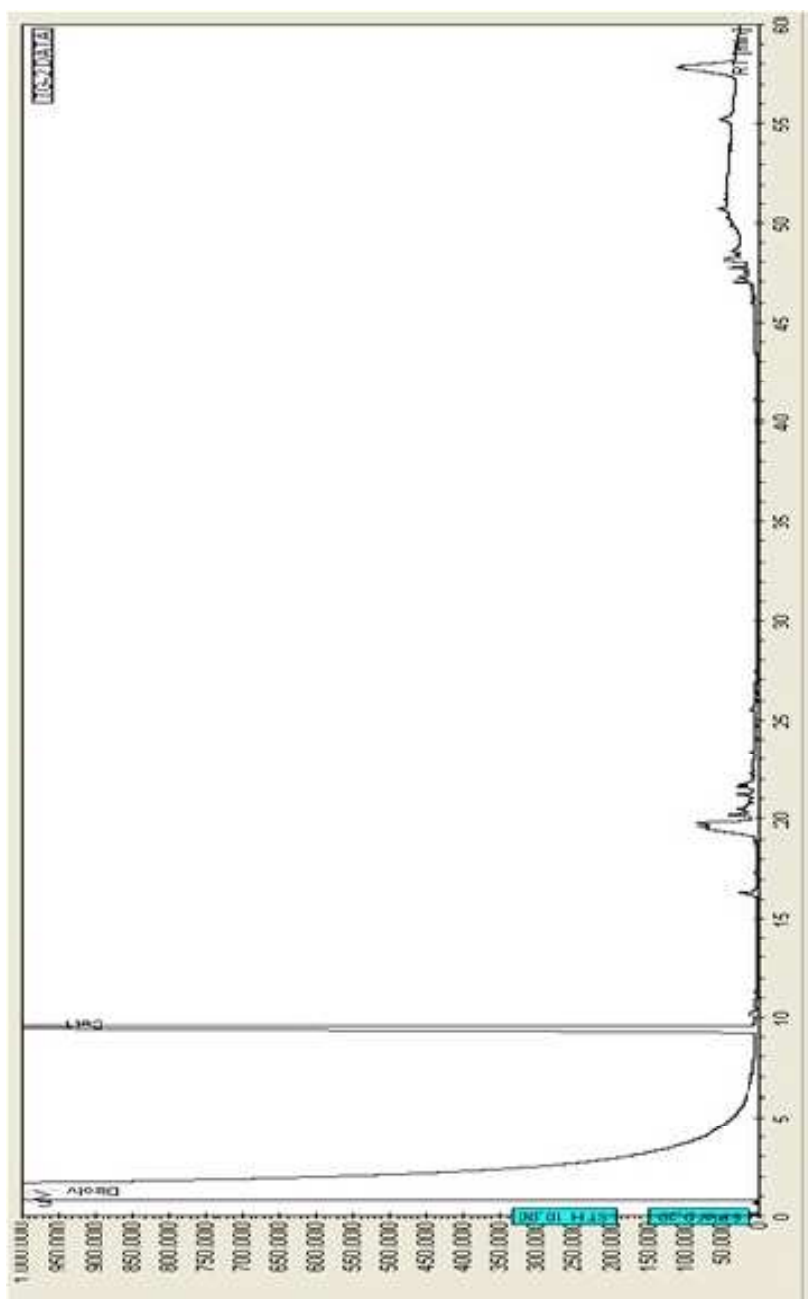


Figura 2.4. Cromatograma del aceite comercial utilizado en las reacciones de metanolisis parcial.

2.2.2. Lipasa *Rhizomucor miehei*

Rhizomucor miehei (Figura 2.5) es un hongo ficomiceto que en un principio se incluyó en el género *Mucor* [316]. Tras un estudio más exhaustivo de su estructura y propiedades se observaron algunas diferencias importantes en cuanto a su morfología y requerimientos térmicos, por lo que se reclasificó dentro del género *Rhizomucor*, que fue definido como taxón por Lucet y Constantin en 1899 [317].

Los hongos pertenecientes al género *Rhizomucor* son termófilos. Lindt (1886), Miehe (1907) y Lucet y Constantin (1900) a principios de siglo, determinaron que la temperatura óptima para el desarrollo de las cepas de estos hongos es 37-40 °C y su temperatura de crecimiento se sitúa desde 22-24 °C hasta 50 °C [318].

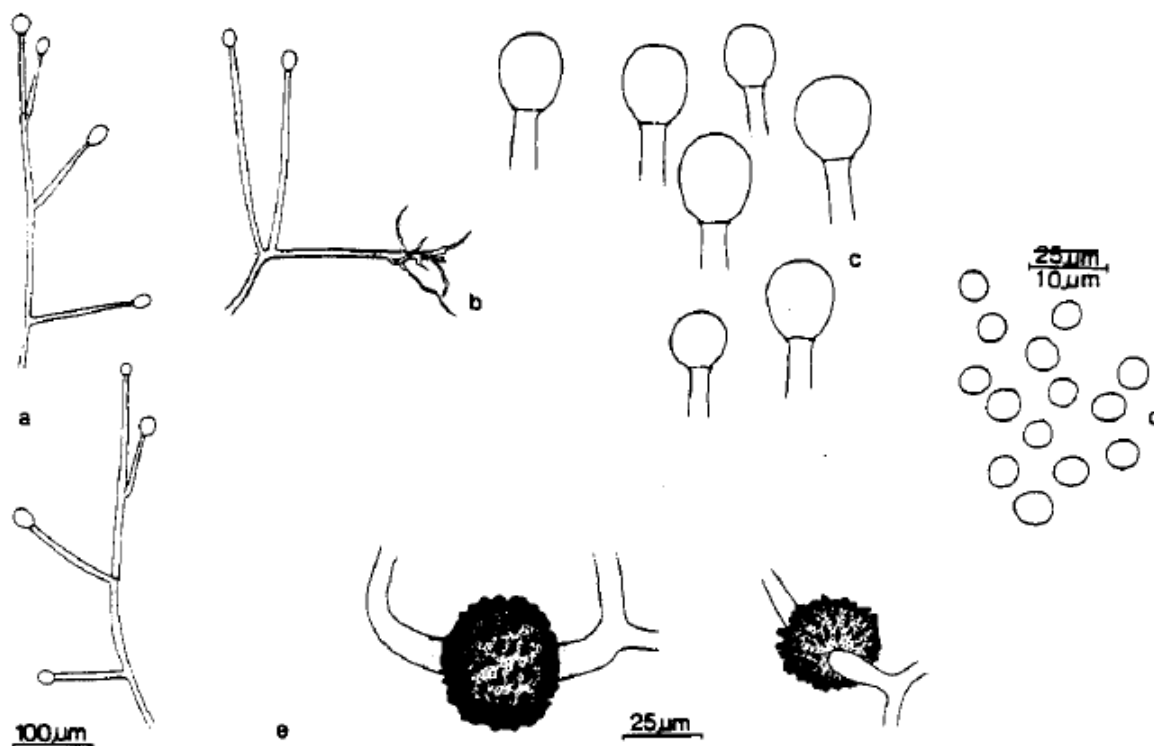


Figura 2.5. Esquema de la morfología del hongo *Rhizomucor miehei*: (a) esporangióforos, (b) rizoides, (c) columelas, (d) esporas, (e) zigosporas entre suspensores.

Se ha obtenido lipasa inmovilizada comercial como la *Rhizomucor miehei* de Novozyme para optimizar estudios anteriores. También se ha utilizado una lipasa libre comercial como la *Mucor miehei* de Sigma para comparar resultados, debido a que es la lipasa comercial que presenta mayor semejanza a la lipasa *Rhizomucor miehei*. Ambas lipasas son muy parecidas.

La heterogeneización de la lipasa seleccionada se lleva a cabo tanto de forma covalente sobre el soporte AlPO_4 /Sepiolita (con 4-aminobencilamina y con p-hidroxibenzaldehído), como inmovilizada por retención física en sepiolita desmineralizada y sílica gel.

En el caso de la inmovilización covalente, la unión de las enzimas se efectuará mediante una cadena hidrocarbonada enlazada con el soporte inorgánico por enlaces fosfamidicos.

También se ha descrito un procedimiento de inmovilización de enzimas basado en su adsorción física en la estructura porosa tridimensional de las sepiolitas, que han sido sometidas previamente a un tratamiento ácido (patente propiedad de la Universidad de Córdoba [260-262, 272]), el cual se utiliza en la inmovilización de las lipasas seleccionadas.

En efecto, las enzimas pueden ser inmovilizadas por adsorción física en materiales naturales de bajo precio, como las sepiolitas naturales. Las sepiolitas, al igual que el resto de filosilicatos, presentan una estructura basada en el apilamiento de planos de iones oxígeno e hidroxilos. Los grupos tetraédricos $(\text{SiO})_4^-$ se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas de extensión infinita y fórmula $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{2-}$, que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos. En ellas, los tetraedros se distribuyen formando hexágonos y el silicio tetraédrico puede estar, en parte, sustituido por Al^{3+} o Fe^{3+} . Estas capas tetraédricas se unen a otras octaédricas de tipo gibsita o brucita y en ellas, algunos Al^{3+} o Mg^{2+} pueden estar sustituidos por Fe^{2+} o Fe^{3+} y más raramente por Li, Cr, Mn, Ni, Cu o Zn. El plano de unión entre ambas capas está formado por los oxígenos de los tetraedros que se encontraban sin compartir con otros tetraedros (oxígenos apicales), y por grupos $(\text{OH})^-$ de la capa brucítica o gibsítica, de forma que, en este plano, quede un $(\text{OH})^-$ en el centro de cada hexágono formado por seis oxígenos apicales. El resto de los grupos $(\text{OH})^-$ son reemplazados por los oxígenos de los tetraedros (Figura 2.6).

En algunos filosilicatos (esmectitas, vermiculitas, micas, etc.) las láminas no son eléctricamente neutras debido a las sustituciones de unos cationes por otros de distinta carga. El

balance de carga se mantiene por la presencia, en el espacio interlaminar, o espacio existente entre dos láminas consecutivas, de cationes (como por ejemplo en el grupo de las micas), cationes hidratados (como en las vermiculitas y esmectitas) o grupos hidroxilo coordinados octaédricamente, similares a las capas octaédricas, como sucede en las cloritas. La unidad formada por una lámina más la interlámina es la unidad estructural. Los cationes interlaminares más frecuentes son alcalinos (Na y K) o alcalinotérreos (Mg y Ca). Las fuerzas que unen las diferentes unidades estructurales son más débiles que las existentes entre los iones de una misma lámina, por ese motivo los filosilicatos tienen una clara dirección de exfoliación, paralela a las láminas.

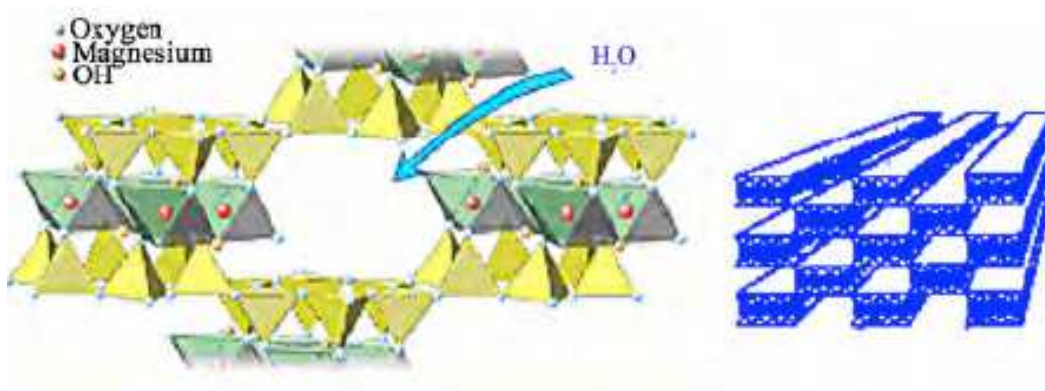


Figura 2.6. Estructura de la sepiolita.

Los canales de $11.5 \times 5.3 \text{ \AA}$, que se desplazan a lo largo de todas las fibras, confieren al sólido una estructura microporosa, responsable de su alta superficie específica [273], similar a la del AlPO_5 [274]. La extracción de los cationes (Mg^{2+} , Al^{3+} , etc.), por tratamiento ácido incrementa de forma apreciable el tamaño de los poros, transformándose en una sílice amorfa [275] o incluso, dependiendo del tratamiento post-extracción del magnesio, puede adquirir una estructura de tipo mesoporoso similar a MCM^{41} [276]. Estos poros voluminosos pueden fijar macromoléculas como por ejemplo, enzimas [260].

Las importantes aplicaciones industriales de este grupo de minerales radican en sus propiedades físico-químicas. Dichas propiedades derivan principalmente de:

- Su extremadamente pequeño tamaño de partícula ($< 2 \text{ mm}$).
- Su morfología laminar (filosilicatos).

- Las sustituciones isomórficas, que dan lugar a la aparición de carga en las láminas y a la presencia de cationes débilmente ligados en el espacio interlaminar.

Como consecuencia de estos factores, estos minerales presentan, por una parte, un valor elevado del área superficial y, a la vez, una gran cantidad de superficie activa, con enlaces no saturados. Por ello pueden interactuar con muy diversas sustancias, en especial compuestos polares, por lo que tienen un comportamiento plástico en mezclas de arcilla-agua con elevada proporción sólido/líquido y son capaces en algunos casos de hincharse, con el desarrollo de propiedades reológicas en suspensiones acuosas. Por otra parte, la existencia de carga en las láminas se compensa, como ya se ha citado, con la entrada en el espacio interlaminar de cationes débilmente ligados y en un estado variable de hidratación, que pueden ser intercambiados fácilmente mediante la puesta en contacto de la arcilla con una solución saturada en otros cationes. Esta propiedad se conoce como capacidad de intercambio catiónico y es también la base de multitud de aplicaciones industriales. Las sepiolitas y paligorskitas son arcillas con un contenido en dichos minerales superior al 50 %. Son minerales con hábito fibroso con una enorme área superficial debida tanto al pequeño tamaño de partícula como a la porosidad estructural que presenta su estructura. La superficie específica teórica se calcula alrededor de los 900 m²/g, aunque la superficie accesible es muy inferior.

Su peculiar estructura les confiere una serie de propiedades, entre ellas las de formar suspensiones poco afectadas por la concentración iónica y una enorme capacidad de adsorción, siendo poderosos decolorantes y absorbentes.

También tienen buenas propiedades reológicas, son capaces de formar geles y suspensiones estables de alta viscosidad a bajas concentraciones de sólido. Al igual que las esmectitas, son susceptibles de ser activadas mediante tratamientos térmicos y ácidos. Los usos a escala industrial de la sepiolita son consecuencia de sus propiedades reológicas, alta superficie específica, baja capacidad de cambio y, sobre todo, su elevado poder absorbente. Por ello se utilizan:

- Como absorbentes, para lechos de animales, suelos, etc.
- Como soporte en aerosoles y aerogeles para pesticidas y fertilizantes.
- Por sus propiedades adsorbentes, en la purificación de productos del petróleo, azúcar...
- En procesos de filtración, floculación y clarificación.

- Por sus propiedades reológicas, en farmacia, pinturas, resinas, y cosmética.
- En cerámica y aislantes.
- En nutrición animal.

Para efectuar las reacciones de transesterificación con este sistema se emplea la misma lipasa *Rhizomucro miehei* y aceite de girasol comercial de uso alimentario. Todas las reacciones de síntesis de biodiesel se realizan con etanol absoluto (Panreac, calidad p. a., y riqueza 99.98 %).

En este caso, como soporte para efectuar la inmovilización covalente de la lipasa, se emplea un sólido, constituido por sepiolita activada AlPO_4 (Sepiolita/ AlPO_4), funcionalizado en su superficie con p-hidroxibenzaldehído. De esta forma, la sepiolita es activada por el AlPO_4 , que se funcionaliza con un radical orgánico. Este radical (un grupo carbonilo) puede fijar la lipasa, mediante su interacción con grupos amino libres, en las lisinas, formando enlaces imínicos [260-262].

La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante Espectroscopía Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa (UV-vis-RD), llevada a cabo en un espectrofotómetro de UV-RD Varian Carey 1E.

A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas se evidencian los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales, capaces de reaccionar (e inmovilizar) las macromoléculas de enzima.

La inmovilización de la lipasa tiene lugar mediante el procedimiento descrito previamente en el apartado anterior. Se han utilizado los siguientes sistemas como soporte:

1) AlPO_4 /Sepiolita

De acuerdo con la metodología indicada en el Plan de Trabajo, la obtención de un sólido amorfo de elevada superficie específica y acidez controlada es el prerrequisito esencial para poder realizar con garantías la activación del soporte. Es decir, se trata de obtener el AlPO_4 amorfo siguiendo un procedimiento ampliamente utilizado por nuestro equipo [277-284, 319-330],

pero introduciendo ciertas modificaciones a lo ya estudiado [260-262, 272], que permitan disponer de un elevado número de centros ácidos superficiales, tipo Brönsted.

Se obtienen excelentes resultados llevando a cabo la reacción entre el tricloruro de aluminio hexahidratado y el ácido ortofosfórico, al 85 % en peso, a temperatura constante de 0 °C, y elevando el pH a 6.1, mediante adición de disolución acuosa de hidróxido amónico. Se forma lentamente un sólido amorfo, según el proceso:



Dicho sólido se ha de lavar con alcohol isopropílico y posteriormente secarse en estufa a 120 °C, durante 24 horas. Este sólido puede proporcionar valores elevados de superficie exterior, así como un elevado número de centros ácidos superficiales si se somete a calcinación en horno mufla durante 3 horas a 350 °C, donde se elimina por sublimación el NH₄Cl formado en la reacción de síntesis (Figura 2.7).

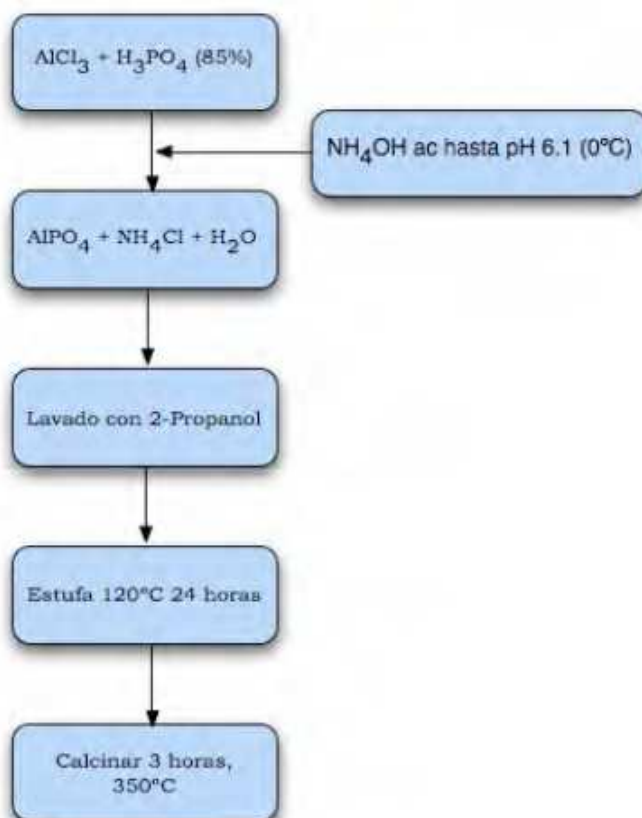


Figura 2.7. Esquema general de síntesis del AlPO₄ amorfo.

La síntesis del soporte AlPO_4 /Sepiolita (20 - 80 % en peso), se lleva a cabo sintetizando el AlPO_4 , según la metodología indicada [277-284, 319-330], en un medio que contiene, junto al tricloruro de aluminio hexahidratado y el ácido fosfórico, la proporción adecuada de sepiolita natural, un silicato de magnesio $\text{Si}_{12}\text{Mg}_8\text{O}_{32} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ con composición química nominal de SiO_2 62.0, MgO 23.0, Al_2O_3 1.7, Fe_2O_3 0.5, CaO 0.5, K_2O 0.6 y Na_2O 0.3, suministrada por Tolsa S.A (Vallecas, Madrid). La sepiolita, un silicato magnésico hidratado natural, de naturaleza fibrosa, elevada superficie y bajo precio, se somete así a un proceso de activación superficial, mediante gelificación o precipitación suave en forma de gel del AlPO_4 , en un medio en el que la relación final Sepiolita/ AlPO_4 amorfo sea del orden 80/20.

De esta forma, la sepiolita incorpora una fina capa externa de AlPO_4 que le hace adquirir superficialmente las propiedades físico-químicas de este soporte, quedando así activado para su posterior funcionalización. Así, este sólido adquiere valores elevados de superficie externa y un elevado número de centros ácidos superficiales.

La funcionalización de la sepiolita empleada como soporte es posible gracias a la presencia de un elevado número de grupos hidroxilos superficiales, de carácter ácido de Brönsted, valorados con 2,6-dimetilpiridina, a través de los cuales se desarrollarán los enlaces fosfamido que “anclan” las diaminas, que permitan la funcionalización del soporte.

La caracterización estructural del sólido inorgánico empleado como soporte habrá de contemplar como mínimo la obtención del valor de su superficie específica, y en menor medida el resto de sus propiedades texturales: forma, tamaño y distribución de poros. Estos parámetros se obtienen mediante la aplicación de la técnica de adsorción de nitrógeno a la temperatura del nitrógeno líquido.

La caracterización de sus propiedades ácido-básicas superficiales es también un dato fundamental para determinar, en última instancia, si la síntesis ha conseguido los resultados deseados, toda vez que el objetivo perseguido es obtener un elevado número de centros ácidos tipo Brönsted, que constituyen los centros activos adecuados para la formación de los enlaces covalentes con las moléculas orgánicas seleccionadas para ello. La aplicación de un procedimiento espectrofotométrico puesto a punto por nuestro equipo de investigación, nos ha permitido obtener estos parámetros.

2) Activación del soporte AlPO_4 /Sepiolita con p-Hidroxibenzaldehído

Siguiendo la síntesis en fase sólida por pasos recogida en la Figura 2.8 y de acuerdo con la metodología descrita [260-262], la funcionalización del soporte tiene lugar a través de la reacción entre 20 g de soporte y 2 g de p-hidroxibenzaldehído en un horno microondas convencional (15 minutos, a 380 W, en periodos de 2 minutos). La activación del soporte se realiza mediante la consecución de un “linker” con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al soporte mediante un enlace covalente. Para ello se harán reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con un aldehído, el p-hidroxibenzaldehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico.

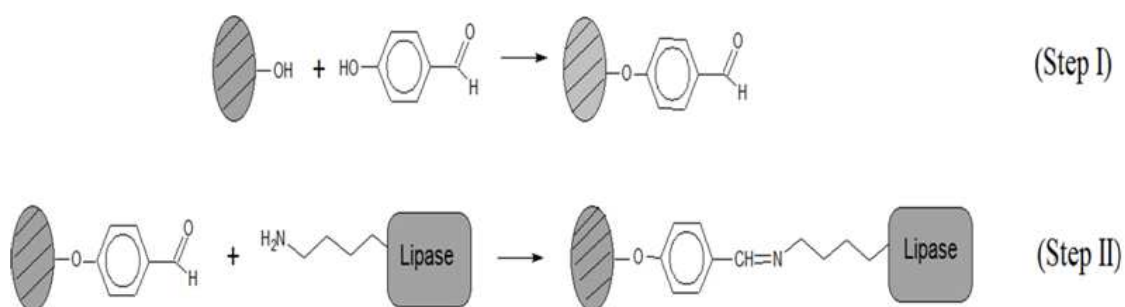


Figura 2.8. Esquema general para la inmovilización de la enzima a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina. La activación del AlPO_4 amorfo se lleva a cabo por microondas, calentado con p-hidroxibenzaldehído (paso 1) antes de la inmovilización covalente de la enzima a través de los residuos de lisina (paso 2).

3) Sistema funcionalizado con p-hidroxibenzaldehído

Siguiendo la síntesis en fase sólida, por pasos, recogida en la Figura 2.8 y de acuerdo con la metodología publicada y patentada [90 - 92, 102], la funcionalización del soporte tiene lugar a través de la reacción entre 20 g de soporte y 2 g de p-hidroxibenzaldehído en un horno microondas convencional durante 15 minutos a 380 W, en periodos de 2 minutos. De forma similar al proceso seguido en el punto anterior, el sólido es homogeneizado con el p-hidroxibenzaldehído durante una hora en rotavapor a temperatura ambiente. Tras este periodo se elimina el éter etílico, por calentamiento en baño de agua en el mismo rotavapor sin efectuar vacío, y a continuación se efectúa la activación por microondas.

La activación del soporte se realiza mediante la consecución de un “*linker*” con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al soporte mediante un enlace covalente, para ello se hacen reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con un aldehído, el p-hidroxibenzaldehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico.

Se usa el sistema AlPO_4 /Sepiolita como soporte, previamente activado y funcionalizado con p-hidroxibenzaldehído, de acuerdo con la síntesis en fase sólida, por pasos, recogida en la Figura 2.12, de acuerdo con la metodología anteriormente descrita. Aquí, se hacen reaccionar los grupos ácidos Brønsted superficiales de carácter ácido del soporte con el grupo p-hidroxilo de un aldehído, el p-hidroxibenzaldehído, que aporta un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico.

Igualmente la reacción de activación se efectúa de forma rápida y limpia, en un horno de microondas convencional. La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante espectroscopia de Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa, UV-vis-RD, cuyos resultados se muestran en la Figura 2.9.

A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas, podemos evidenciar los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales, capaces de reaccionar e inmovilizar las enzimas.

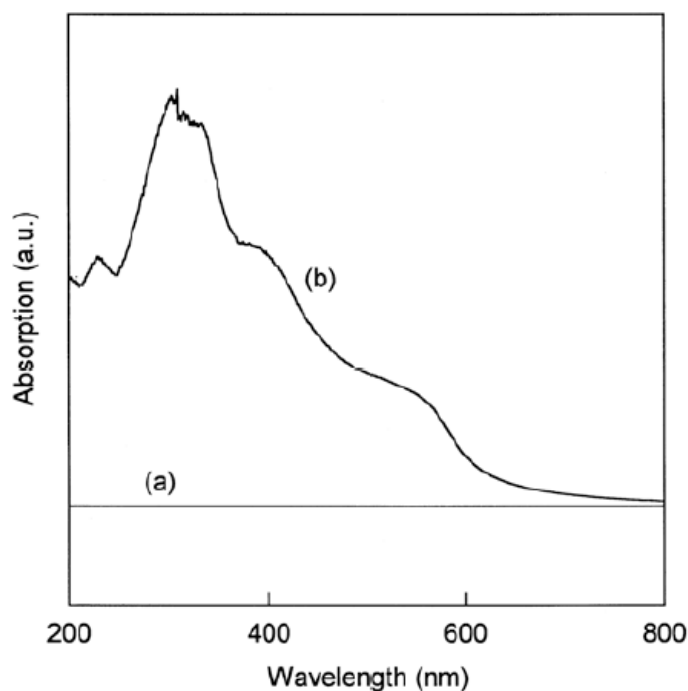


Figura 2.9. Espectroscopía de UV-vis-RD obtenidas en las diferentes etapas: (a) soporte Sepiolita/ AlPO_4 ; (b) soporte activado después del calentamiento por microondas con p-hidroxibenzaldehído.

4) Activación del soporte AlPO_4 /Sepiolita con 4-aminobencilamina y tereftaldialdehído

La funcionalización del sistema AlPO_4 /Sepiolita, utilizado como soporte inorgánico para la inmovilización covalente de enzimas [260-262, 272], se ha llevado a cabo exclusivamente con dos moléculas, p-hidroxibenzaldehído y 4-amino-bencilamina. La reacción de los grupos hidroxilo del fenol y amino, respectivamente se conduce muy eficazmente operando en "fase seca" y mediante irradiación en horno microondas. Es decir, en ausencia de disolvente, y sometiendo el sólido activado, en el que se ha impregnado el p-hidroxibenzaldehído o la 4-amino-bencilamina, a irradiación en microondas durante breves minutos.

Para la inmovilización covalente de la lipasa, usando como soporte AlPO_4 /Sepiolita (20 - 80% en peso), previamente activados con 4-aminobencilamina y aldehído tereftálico, de acuerdo con la síntesis en fase sólida por pasos recogida en la Figura 2.10, la activación del soporte se realizará mediante la consecución de un "linker" con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al soporte con un enlace covalente. Para ello se harán reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con una diamina, la 4-

aminobencilamina, y posteriormente con un dialdehído aromático, el tereftaldialdehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico.

El proceso de activación se lleva a cabo, por tanto, en dos etapas, pudiéndose efectuar en el mismo matraz de reacción, tras el lavado conveniente del sólido, tras cada reacción. Además, ambas reacciones se efectúan de forma rápida y limpia, en un horno microondas convencional. La reacción de los grupos ácidos superficiales del soporte, con uno de los grupos amino terminales de la aminobencilamina, se lleva a cabo mediante la homogeneización en un matraz de 100 mL, de 20 g del soporte AlPO_4 /Sepiolita, 80 mL de éter etílico y 4 mL de aminobencilamina (Merck, 99 %), durante una hora en rotavapor a temperatura ambiente. Estas cantidades proporcionan las condiciones denominadas de “humedad incipiente” que permiten la homogeneización de la mezcla empleando la mínima cantidad de disolvente.

A continuación se elimina el éter etílico, por calentamiento en baño de agua en el mismo rotavapor pero sin efectuar vacío, ya que hierve a 33 °C. A continuación se introduce el matraz en un horno microondas doméstico donde se le somete, durante quince minutos (en periodos de 2 minutos), a irradiación a 380 W. Tras varios lavados con éter etílico del sólido funcionalizado, para eliminar el reactivo que no ha reaccionado con el sólido, éste se vuelve a impregnar en rotavapor con aldehído tereftálico, 4 g, que tras eliminar en rotavapor el éter etílico, se somete a una nueva activación en microondas, irradiando a 380 W durante cinco minutos. La alta conjugación de la molécula enlazada al soporte inorgánico, tras la formación del enlace imínico, proporciona un color amarillo intenso al sólido activado. Eliminado el aldehído tereftálico que no ha reaccionado por lavado con éter etílico, el soporte activado está listo para ser empleado en la inmovilización de las lipasas.

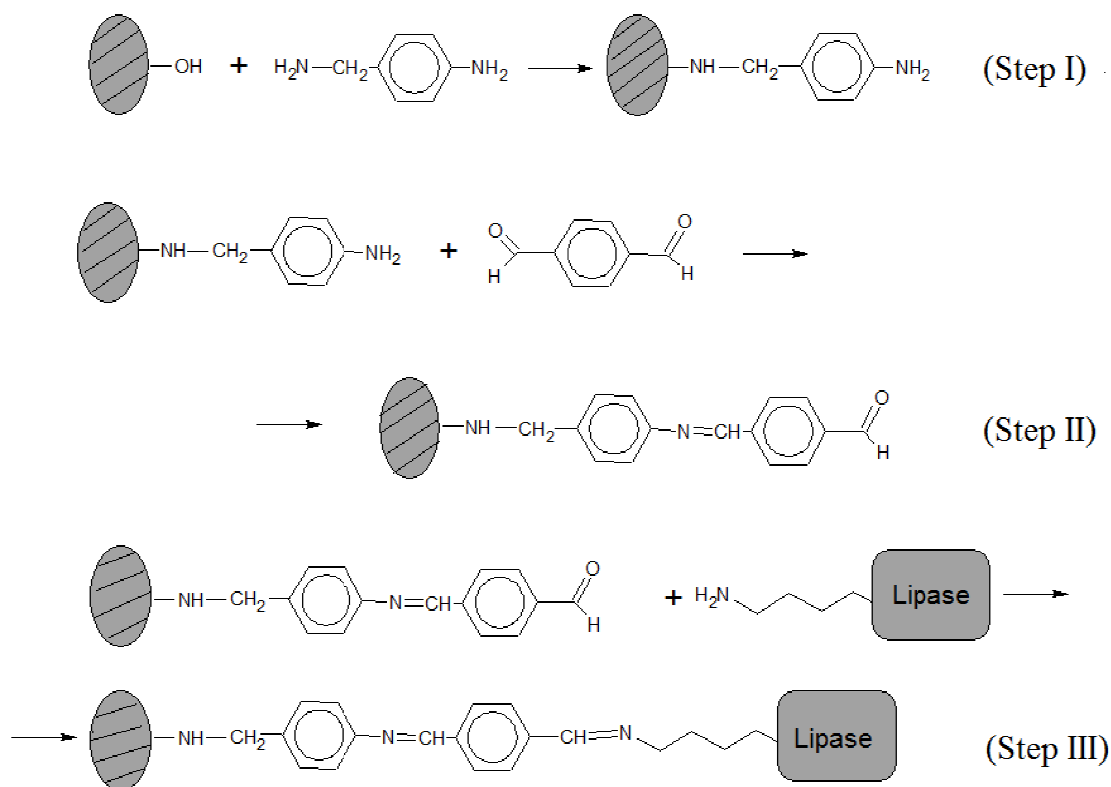


Figura 2.10. Esquema general para la inmovilización de la enzima (en este caso de la PPL) a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de la lisina. La activación del AlPO_4 amorfo soportado por microondas calentado con 4-aminobencilamina (paso 1), y activación post-sintética con tereftaldicarboxaldehído (paso 2) antes de la inmovilización covalente de la enzima a través de los residuos de lisina (paso 3).

5) Sistema funcionalizado con 4-aminobencilamina y tereftaldialdehído

La reacción de los grupos ácidos superficiales del soporte, con uno de los grupos amino terminales de la aminobencilamina, se lleva a cabo mediante la homogeneización en un matraz de 100 mL, de 20 g del soporte AlPO_4 /Sepiolita, 80 mL de éter etílico y 4 mL de aminobencilamina (Merck, 99 %), durante una hora en rotavapor a temperatura ambiente. Estas cantidades proporcionan las condiciones denominadas de "humedad incipiente" que permiten la homogeneización de la mezcla empleando la mínima cantidad de disolvente. A continuación se elimina el éter etílico, por calentamiento en baño de agua en el mismo rotavapor pero sin efectuar vacío, ya que hierve a 33 °C. A continuación se introduce el matraz en un horno microondas doméstico donde se le somete, durante quince minutos (en periodos de 2 minutos), a irradiación a 380 W. Tras varios lavados con éter etílico del sólido funcionalizado, para eliminar el reactivo que no ha reaccionado con el sólido, éste se vuelve a impregnar en rotavapor con

aldehído tereftálico, 4 g, que tras eliminar en rotavapor el éter etílico, se somete a una nueva activación en microondas, irradiando a 380 W durante cinco minutos. La alta conjugación de la molécula enlazada al soporte inorgánico, tras la formación del enlace imínico, proporciona un color amarillo intenso al sólido activado (Figura 2.11). Eliminado el aldehído tereftálico que no ha reaccionado por lavado con éter etílico, el soporte activado está listo para ser empleado en la inmovilización de las lipasas.

La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante la técnica de espectroscopía de Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa, UV-vis-RD dada la gran sensibilidad que presenta dicha técnica, lo que la hace especialmente útil e imprescindible en el seguimiento de la evolución de las superficies de los sólidos tras los tratamientos de funcionalización y/o sucesivas modificaciones químicas superficiales. Se lleva a cabo en un espectrofotómetro de UV-RD Varian Carey 1E, realizando barridos correspondientes a longitudes de onda entre 200 y 800 nm. A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas (Figura 2.11), se pueden evidenciar los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales (Figura 2.10), capaces de reaccionar con aminoácidos de las enzimas. Estos cambios se pueden observar también visualmente en la Figura 2.12.

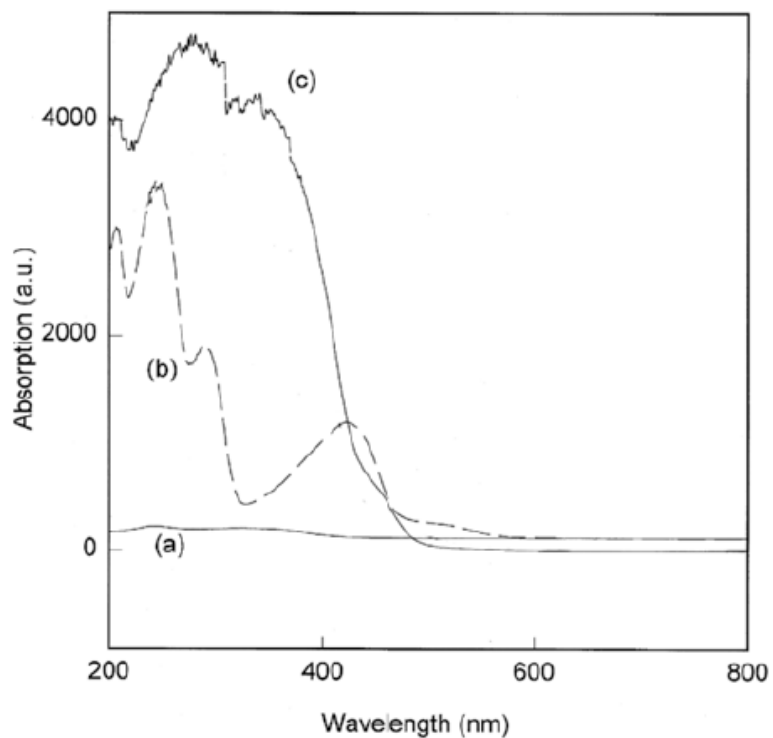


Figura 2.11. Espectroscopía de UV-vis-RD obtenidas en las diferentes etapas: (a) soporte Sepiolita/ AlPO_4 ; (b) soporte activado después del calentamiento por microondas con 4-aminobenzilamina, (c) soporte funcionalizado con el tereftaldialdehído.



Figura 2.12. De izquierda a derecha se presentan las imágenes de (a) soporte Sepiolita/ AlPO_4 ; (b) soporte activado después del calentamiento por microondas con 4-aminobenzilamina, (c) soporte funcionalizado con el tereftaldialdehído.

6) Soporte Sepiolita Desmineralizada

A fin de evaluar el efecto del tratamiento de desmineralización se realizan una serie de ensayos en los que se emplea la sepiolita de Tolsa S.A, Vallecas (Madrid), sin ningún tratamiento especial, en forma pura. Estos resultados se han comparado con los obtenidos cuando esta misma sepiolita es sometida a un tratamiento ácido desmineralizante, como soporte de la lipasa [260, 272], frente a la producción de biodiesel mediante la transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto.

El tratamiento ácido desmineralizante se lleva a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética en un vaso de precipitado con 400 cm³ de una disolución 1 M de HCl y 40 g de sepiolita. Cada 8 horas, se determina la presencia de Mg en el sobrenadante empleando “amarillo titán” como indicador específico. El lavado ácido se repite hasta que se determina la ausencia de Mg. Para mantener la estructura fibrosa así obtenida, el sólido resultante se mantiene en todo momento en condiciones de humedad incipiente. Para la inmovilización de la enzima se sigue la metodología descrita [271], poniendo en contacto en el matraz de reacción 1.7 g de sepiolita desmineralizada, 0.04 g de lipasa y 6 mL de etanol absoluto. Antes de efectuar la reacción se mantiene a 4 °C con agitación ocasional, durante 24 horas. Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre la sepiolita natural sin desmineralizar se sigue la metodología descrita [260], poniendo en contacto en el matraz de reacción 5 g de esta sepiolita sin desmineralizar, 0.2 g de lipasa, 5 mL de etanol absoluto y 5 mL de agua destilada. Antes de efectuar la reacción se mantiene con agitación controlada en rotavapor (1 hora, 25 °C).

7) Sistema sepiolita desmineralizada

Para efectuar las reacciones de transesterificación con estos sistemas se emplea igualmente la misma lipasa comercial *Rhizomucor miehei* y el mismo aceite de girasol comercial para uso alimentario, empleado como sustrato. La reacción de transesterificación se ha llevado a cabo con etanol absoluto (Panreac, calidad p.a., y riqueza 99.98 %).

A fin de evaluar el efecto del tratamiento de desmineralización se realizan una serie de ensayos en los que se emplea la sepiolita de Tolsa S.A, Vallecas (Madrid), sin ningún tratamiento especial, en forma pura. Estos resultados se han comparado con los obtenidos cuando esta misma sepiolita es sometida a un tratamiento ácido desmineralizante, como soporte

de la lipasa [260,272], frente a la producción de biodiesel mediante la transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto.

Para la inmovilización de la enzima se sigue la metodología descrita [271], poniendo en contacto en el matraz de reacción 1 g de sepiolita desmineralizada, 0.04 g de lipasa y 6 mL de etanol. Antes de efectuar las reacciones, se mantiene el matraz a 4 °C con agitación ocasional, durante 24 horas.

Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre la sepiolita natural sin desmineralizar se sigue la metodología descrita [260], poniendo en contacto en el matraz de reacción 5 g de esta sepiolita sin desmineralizar, 0.2 g de lipasa, 5 mL de etanol absoluto y 5 mL de agua destilada. Antes de efectuar la reacción se mantiene con agitación controlada en rotavapor (1 hora, 25 °C).

El sólido que contiene la enzima inmovilizada es separado por centrifugación, y el filtrado resultante es separado también para determinar la cantidad de lipasa que permanece en la disolución sobrenadante. La actividad catalítica de esta disolución es proporcional a la cantidad de enzima disuelta en la misma, por lo que se puede determinar así la cantidad de lipasa que no ha sido inmovilizada. La comparación de este valor con la actividad de la enzima inmovilizada y libre permite determinar la cantidad de enzima inmovilizada, y la eficiencia del proceso.

8) Silicagel

Además de los soportes sintetizados descritos con anterioridad, hemos utilizado un soporte comercial debido a su reducido precio, silicagel 60 (Merck, pa.) tamizado 0,015-0,040 mm, con el que se puede conseguir hacer viable la utilización de la lipasa para la obtención de un biocombustible, ya que se puede utilizar dicha lipasa un mayor número de veces.

2.2.3. Sistema KF soportado

Para la síntesis de los sistemas KF soportados al 10% sobre tres diferentes soportes (alúmina, óxido de magnesio y óxido de zinc) se ha seguido un procedimiento de impregnación a “humedad incipiente” con una disolución de KF (Panreac p.a.) en metanol-agua descrito con anterioridad [331].

Primero se someten a elevadas temperaturas los diferentes sólidos inorgánicos en un horno de mufla para llegar a 400 ° C en el transcurso de una hora (100 ° C cada 15 min). Después se calcinan durante 3 h a esta temperatura, para conseguir la eliminación completa del agua de hidratación antes de efectuar la impregnación del KF.

Para ello se mezclan 9 g de soporte y 7 mL de una disolución con 1 g de KF en 5 mL de metanol y 2 mL de agua, agitando continuamente en un rotavapor durante una hora.

A continuación se procede a eliminar el disolvente por evaporación a sequedad. Después, las muestras se secaron a 150 ° C en una estufa durante 24 h, y por último se almacenaron en un desecador.

2.2.4. Óxido de calcio

El óxido de calcio de Panreac QP, se sirve en forma de piezas de tamaño variable (2-7 cm de diámetro), como se muestra en la Figura 2.13.

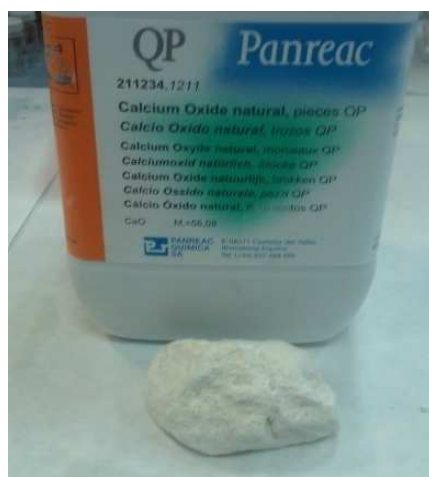


Figura 2.13. Muestra del tamaño inicial de las piezas de óxido de calcio.

Antes de su introducción en el molino de bolas Retsch PM 100 (Figura 2.14), las piezas de gran tamaño se someten a una primera operación manual de molido que reduce el tamaño a 2 mm de diámetro aproximadamente. Las bolas molerán el CaO a 350 rpm durante 10 minutos y una vez finalizada la molienda se pasará por el tamiz #0.3 mm para conseguir el tamaño máximo de grano que se usará en las reacciones.



Figura 2.14. Molino de bolas Retsch PM 100.

Por último el CaO se somete a calcinación en mufla que con una temperatura inicial de 30 °C, asciende a 10°C/min hasta los 600 °C, se mantiene la temperatura constante a 600 °C durante 6 horas y dejamos que descienda la temperatura unas 3 horas, antes de depositar el sólido pulverulento en un recipiente cerrado, evitando el contacto con el aire.

En este tratamiento de calcinación hemos obtenido CaO a partir de CaCO₃, eliminando el CO₂ según se muestra en la siguiente Figura 2.15, relacionando la temperatura necesaria con la presión [332].

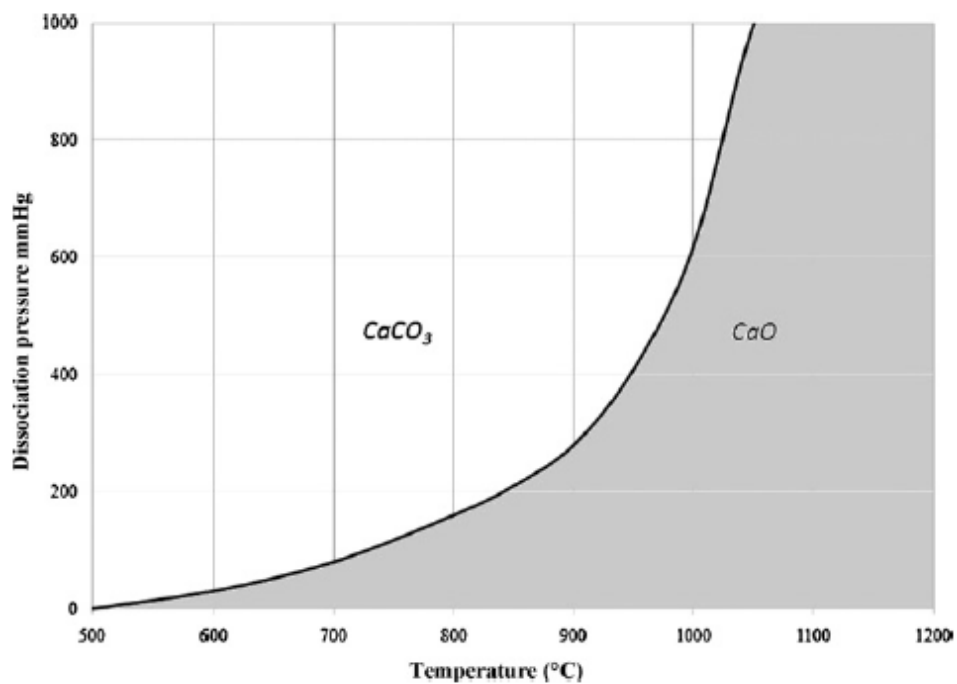


Figura 2.15. Relación presión-temperatura para eliminar el CO₂ presente en el carbonato cálcico y obtener óxido de calcio [332].

2.3. Diseño experimental en las reacciones de transesterificación

Para la determinación de la eficiencia de los sistemas estudiados, se llevan a cabo reacciones de transesterificación de aceites para la obtención de Biocombustibles. Estas reacciones se efectúan en un reactor de tanque agitado (Batch) y a presión atmosférica. Se estudiarán un rango de temperaturas, variación en la relación molar aceite/alcohol (etanol para la lipasa y metanol para el catalizador heterogéneo), la influencia del agua en la reacción y diferentes tiempos de reacción dependiendo del catalizador utilizado. Siempre se usarán 12 mL de aceite de girasol, en un matraz de 25 mL que se acopla a un soporte en baño de agua termostatzado, con agitación magnética de 700 rpm, como se muestra en la Figura 2.16.



Figura 2.16. Dispositivo experimental utilizado para efectuar la reacción de transesterificación de aceite de girasol para la obtención de Biocombustible.

Por último, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 3500 rpm para separar con seguridad el catalizador del biocombustible, de forma que éste no afecte los valores de la viscosidad del producto de reacción.

En el estudio del Óxido de Calcio (CaO) se han evaluado las siguientes variables: temperatura, relación aceite/metanol, peso de catalizador (manteniendo constantes la velocidad de agitación, el tiempo de reacción y la cantidad de aceite).

Para determinar las variables que influyen en el proceso catalítico se han seguido dos metodologías diferentes:

- 1) Estudio de los diferentes parámetros que pueden afectar a la reacción, temperatura, cantidad de catalizador, relación aceite/alcohol, pH (en el caso de la lipasa), etc. Se usan rangos al azar dentro de las diferentes variables, basándonos en la bibliografía disponible

Una vez seleccionados los parámetros determinantes de la reacción, se pasa a un estudio estadístico, que es la segunda metodología utilizada.

- 2) El análisis factorial es un método de variación múltiple en el cual, todos los parámetros cambian simultáneamente de manera programada. De este modo se desarrolla un estudio eficiente y racional de las variables elegidas en todo su intervalo, que permite obtener una información adicional de los efectos debidos al conjunto de dos o más variables [333]. Este tipo de diseño experimental se está usando ampliamente en la actualidad para analizar la influencia de los parámetros de reacción en todo tipo de procesos, y concretamente en la producción enzimática de biodiesel [334-339]. En la presente Memoria se ha utilizado esta metodología para analizar el efecto de las variables más influyentes en el proceso de transesterificación enzimática llevado a cabo por varias enzimas, mediante el uso del análisis ANOVA.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En éste capítulo se exponen y discuten, de forma ordenada, los resultados de los experimentos llevados a cabo con cada uno de los catalizadores utilizados para la síntesis de biocombustibles que integran la glicerina en su composición, tanto con la lipasa *Rhizomucor miehei* (libre como inmovilizada) como los catalizadores heterogéneos (los sistemas KF soportados y el CaO puro).

Se exponen los resultados obtenidos en los diseños experimentales realizados para optimizar las condiciones de reacción de cada uno de estos catalizadores. Así, se ha estudiado la influencia de las diferentes variables (temperatura, relación aceite/alcohol, cantidad de catalizador, cantidad de agua presente, etc.) que afectan la reacción de transesterificación, atendiendo a varios parámetros de interés, como pueden ser: la conversión de aceite a biocombustible (contenido en FAME o FAEE), monoglicéridos y diglicéridos (mezclados con los FAME o FAEE) y la viscosidad cinemática (que se puede considerar un parámetro clave para comprobar los porcentajes de mezcla máximos permitidos de estos biocombustibles con diesel comercial para su uso en motores diesel).

También, se lleva a cabo la evaluación de la posibilidad de reutilización de los diferentes catalizadores investigados, enzimáticos y sólidos básicos.

Para evaluar los límites de aplicación directa de los diferentes aceites vegetales se ha medido la viscosidad de las mezclas de diferentes aceites vegetales con diesel convencional. La viscosidad cinemática del biodiesel medida a 40 °C debe estar en el rango 3.5-5.0 cSt, según la norma EN-14214 (especificaciones en Europa). Según la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales "ASTM" D-6751 (especificaciones en U.S.A) la viscosidad cinemática debe ser 1.9-6.0 cSt. Se consideran aceptables mezclas para el combustible diesel en el límite de 2.0-4.5 cSt, por lo que el contenido de la mezcla debe estar en torno a estas viscosidades. Objetivamente, la aplicación de mezclas con diesel por debajo de estos límites, no justifica la realización de ningún tipo de tratamiento a los aceites, ya que los FAME (o MG) no aportan más que una viscosidad más reducida (y por lo tanto más parecida) al diesel fósil.

3.1. Evaluación de la capacidad de las mezclas directas aceite/diesel para reemplazar el diesel fósil

Se han determinado los límites de aplicación de las mezclas directas del diesel fósil con aceites refinados y usados, para comprobar y valorar su posible utilización, mediante la determinación de la viscosidad de las mismas. Los aceites vegetales presentan valores de viscosidad superiores a 30.0 cSt, lo que impide su empleo directo en los motores diesel convencionales. Las mezclas con diesel bajan en diferente proporción su viscosidad, siendo el límite para el combustible diesel de 2.0-4.5 cSt, por lo que la mezcla debe estar entorno a estas viscosidades.

Los aceites evaluados en estas mezclas son aceite de colza, girasol, soja, ricino y dos tipos de aceites usados (que denominaremos aceite usado 1 y aceite usado 2), con diferentes viscosidades. El Diesel de origen fósil utilizado para estas mezclas tiene una viscosidad de 3.15 cSt. Los resultados obtenidos para las mezclas del diesel con los diferentes aceites se recogen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Viscosidad de los biocombustibles obtenidos mediante la mezcla directa de diversos aceites: girasol, viscosidad 32.00 cSt; soja, viscosidad 35.99 cSt; colza, viscosidad 32,47 cSt; ricino, viscosidad 227.0 cSt; aceite usado 1, viscosidad 40.2 cSt y aceite usado 2, viscosidad 54.99 cSt; con diesel fosil de viscosidad 3.15 cSt, en los porcentajes indicados, expresados en la forma convencional B2.5 a B30.

Mezcla	Mezcla (%)	Girasol (cSt)	Soja (cSt)	Colza (cSt)	Ricino (cSt)	usado 1 (cSt)	usado 2 (cSt)
B2.5	2.5	3.32	3.32	3.35	3.41	3.29	3.41
B5	5	3.48	3.58	3.65	3.74	3.58	3.74
B7.5	7.5	3.51	3.87	4.01	4.10	4.01	4.20
B10	10	3.61	4.30	4.36	4.56	4.56	4.56
B12.5	12.5	3.88	4.73	4.51	5.09	4.63	4.73
B15	15	4.14	5.19	5.07	5.75	4.93	5.75
B20	20	5.12	5.94	5.52	7.29	5.55	7.00
B25	25	5.88	6.86	6.04	9.26	6.47	7.72
B30	30	6.63	7.63	6.80	12.16	7.39	9.30

En la Figura 3.1 aparecen representados los valores de viscosidad de las mezclas con los diferentes aceites indicando con una línea roja el límite legal de viscosidad. Como puede observarse presentan un comportamiento variable, a partir de la mezcla B5. Por debajo de B10 podemos concluir que puede emplearse mezcla con cualquiera de los aceites evaluados. El aceite de girasol, probablemente debido a la mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, es el que permite su aplicación a concentraciones más elevadas, B15 al menos.

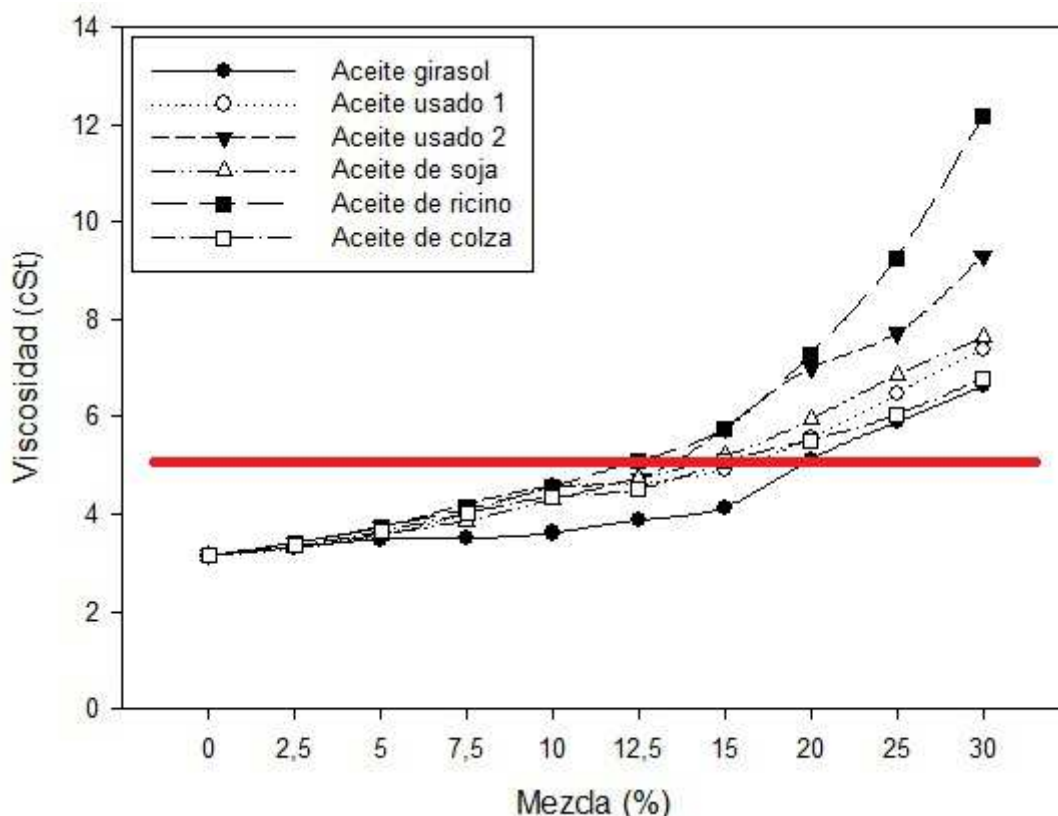


Figura 3.1. Representación gráfica de la viscosidad de las mezclas directas de Diesel/Aceite, diesel de origen fósil de viscosidad 3.15 cSt con diferentes aceites de diferentes viscosidades.

De acuerdo con estos resultados, es técnica y económicamente viable el empleo de estas mezclas para obtener los niveles de reemplazo del diesel fósil. Sólo la formulación de mezclas de diesel con biocombustibles renovables por encima de los porcentajes indicados, exige la realización de algún tratamiento físico-químico para reducir la viscosidad de los aceites vegetales. En este sentido, su transformación a FAMEs permitiría su mezcla en cualquier proporción (incluso su uso en forma pura), pero como contrapartida tendríamos la obtención de una cantidad no despreciable de glicerina. En este contexto, sería más rentable económicamente obtener un biocombustible que, presentando una viscosidad algo superior a la correspondiente a

las mezclas de FAMES, no genere glicerina alguna, evitando así el costo asociado a su gestión. Debido a esto se determinarán los valores máximos que se pueden mezclar empleando el biocombustible obtenido mediante transesterificación parcial, con los diferentes catalizadores investigados, enzimáticos o básicos.

3.2. Lipasa *Rhizomucor Miehei*

3.2.1. Determinación de la influencia del medio de reacción en la actividad de la lipasa libre *Mucor miehei* y de la inmovilizada comercial *Rhizomucor miehei*

Antes de realizar el estudio de la influencia de los diferentes parámetros de reacción (temperatura, relación molar aceite/etanol absoluto, cantidad de lipasa, etc.), tanto de la lipasa libre *Mucor miehei* y la inmovilizada comercial *Rhizomucor miehei*, se han realizado unas reacciones previas para determinar la influencia del propio medio de reacción en la reacción de etanolisis, constituido por una mínima concentración acuosa alcalina que actúa como co-factor de la actividad lipasídica. Para cuantificar dicha influencia se realiza la misma reacción sin lipasa, que se denomina “blanco” (Tabla 3.2), con la lipasa *Mucor miehei* (Tabla 3.3) y con la lipasa *Rhizomucor miehei* (Tabla 3.4). La comparación de las reacciones sin lipasa y con las dos lipasas estudiadas se muestra en la Figura 3.2. Las condiciones que hemos usado para este estudio, de acuerdo con resultados anteriores [340] han sido 12mL de aceite de girasol, 3.5mL de etanol absoluto, temperatura de 30°C, diferentes cantidades de disolución acuosa NaOH 10 N (que actúa como promotor de la actividad enzimática), una agitación constante de 700rpm y durante 2 horas.

Tabla 3.2. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite, 3.5 mL EtOH, temperatura de 30 °C, agitación mayor de 300 rpm, durante 2 h, para la etanolisis del aceite de girasol en diferentes medios y en ausencia de lipasas.

H ₂ O (μl)	NaOH 10N (μl)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	0	15,56	-	-
12,5	0	15,58	2,93	1,83
0	12,5	13,11	6,17	3,09
0	25	9,46	26,54	22,81
0	37,5	8,81	22,94	19,66
0	50	10,40	23,50	19,69

Tabla 3.3. Rendimiento de la lipasa libre *Mucor Miehei* en las condiciones: 12 mL aceite, 3.5 mL EtOH absoluto, 0.01 g de enzima, temperatura de 30 °C, con diferentes cantidades de disolución acuosa NaOH 10 N con agitación de 300 rpm durante 2 h.

NaOH (10N) (μ l)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	15,93	-	-
12,5	11,52	28,84	21,53
25	10,60	36,47	34,54
37,5	9,64	49,97	47,16
50	11,19	29,92	23,10

Tabla 3.4. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite girasol, 3.5 mL EtOH absoluto, temperatura de 30°C, con cantidades crecientes de disolución acuosa NaOH 10N, con 40mg de lipasa *Rhizomucor miehei* de Novozyme y agitación de 300rpm durante 2h.

NaOH 10N (μ l)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	16,01	-	-
12,5	12,34	14,75	5,92
25	9,13	47,14	39,89
37,5	7,75	60,27	40,85
50	9,00	50,94	40,51

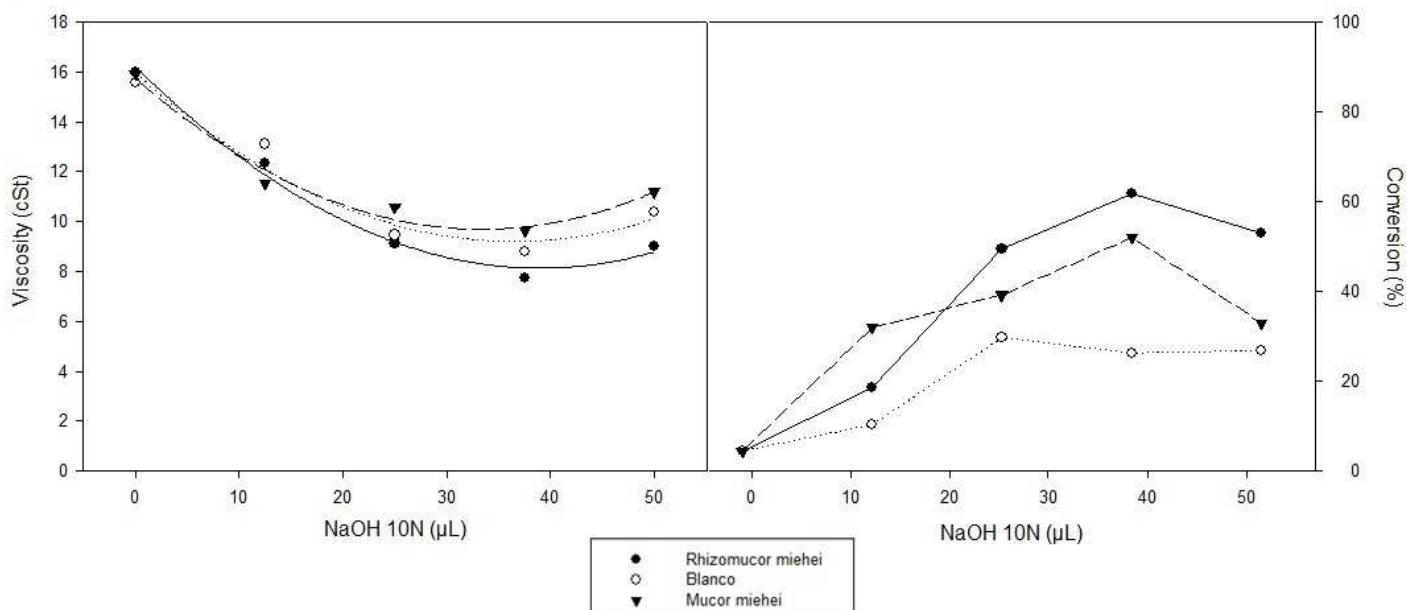


Figura 3.2. Variación de la viscosidad de los productos de reacción obtenidos empleando las dos diferentes lipasas estudiadas, una lipasa libre *Mucor miehei* (▼) y la lipasa inmovilizada *Rhizomucor miehei* de Novozyme (●), frente al blanco (○), operando en un medio con diferentes cantidades de una disolución acuosa NaOH 10N, según los datos recogidos en las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4, operando a 30 °C.

De acuerdo a los resultados recogidos en la Tabla 3.2, las mínimas cantidades de disolución acuosa NaOH 10N no ejercen por sí mismos efectos decisivos en la conversión, ya que siempre se obtienen valores similares en el rango 20-25%, con cantidades $\geq 25 \mu\text{l}$, con valores de viscosidad en el intervalo 10-15 cSt. El acusado descenso de la viscosidad se debe al alto contenido en etanol de la mezcla de reacción. Las dos lipasas muestran comportamientos muy diferenciados. Así, la lipasa libre *Mucor Miehei* (Tabla 3.3) no experimenta ningún tipo de cambio por la acción del medio crecientemente iónico/alcalino, pero la lipasa inmovilizada *Rhizomucor miehei* de Novozyme, experimenta un creciente aumento de la conversión y selectividad (Tabla 3.4), como consecuencia de la acción de la lipasa con el medio; en ausencia de lipasas no se obtiene este aumento de conversión y selectividad.

Como se puede apreciar en la Figura 3.2, la viscosidad en las distintas reacciones sin lipasa se reduce desde 32 cSt del aceite de girasol comercial hasta un valor mínimo con cantidades $\geq 25 \mu\text{L}$ en las distintas reacciones con las diferentes cantidades de NaOH 10N. Podemos ver que en las reacciones sin ninguna cantidad de NaOH 10N, muestran valores de viscosidad bastante similares en las 3 reacciones, pero en las reacciones con cantidades de

NaOH 10N comprendidas entre 10 y 50 μL , la lipasa inmovilizada comercial *Rhizomucor miehei* mejora la viscosidad respecto a la reacción sin lipasa, hasta un valor de 37,5 μL (donde se alcanza el mínimo de viscosidad), pero en el caso de la lipasa libre *Mucor miehei*, la mejora de la viscosidad respecto a la reacción sin lipasa se obtiene en la reacción con 12,5 μL de NaOH 10N.

3.2.2. Influencia de los diferentes parámetros de reacción en la actividad de la lipasa libre *Mucor miehei*

Una vez establecidos los niveles óptimos de la fuerza iónica más adecuada para el funcionamiento de la lipasa libre *Mucor miehei* (que en este caso, según los datos de la Tabla 3.3, corresponde a la obtenida mediante la adición de 12.5 μL de disolución acuosa NaOH 10N), se procede a la optimización de los diferentes parámetros de reacción (temperatura, relación molar aceite/etanol absoluto y cantidad de lipasa, idóneos para efectuar el proceso de etanolisis selectiva enzimática.

A continuación, en la Tabla 3.5 se muestra el estudio realizado para comprobar la influencia de la temperatura en las condiciones de reacción, utilizando la lipasa libre *Mucor miehei* como biocatalizador. La Tabla 3.6 muestra el estudio realizando para estudiar la influencia de la relación molar aceite/etanol absoluto. La Tabla 3.7 muestra la influencia de la adición de lipasa libre *Mucor miehei* en el medio de reacción.

Tabla 3.5. Variación de la actividad enzimática de la lipasa libre *Mucor Miehei*, operando a diferentes temperaturas, en condiciones estándar: 12 mL aceite, 3.5 mL EtOH absoluto, 0.01 g de enzima (reutilizada), 12.5 μl NaOH 10 N, con agitación de 300 rpm y durante 2 h.

Temperatura (° C)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
25	19,52	-	-
30	10,64	45,49	39,13
35	13,35	34,55	32,66
40	13,58	5,75	4,05
45	8,69	21,54	19,05

Tabla 3.6. Variación de la actividad enzimática de la lipasa libre *Mucor Miehei*, operando a diferentes relaciones molares aceite/etanol absoluto, en condiciones estandar: con 12 mL aceite de girasol, y diferentes volúmenes de EtOH absoluto, 0.01 g de enzima, 12.5 µl NaOH 10 N, operando a 30 °C, con agitación 300 rpm y un tiempo de reacción de 2 horas.

Aceite/EtOH (mL/mL)	Aceite/EtOH (mol/mol)	EtOH abs. (ml)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
2,3	(1/2)	1,2	17,72	4,52	2,84
2,9	(1/4)	2,3	14,75	7,17	5,16
3,5	(1/6)	3,5	11,52	28,84	21,53
4,1	(1/8)	4,6	9,57	31,00	24,53
4,7	(1/10)	5,8	9,39	19,28	16,33

Tabla 3.7. Variación de la actividad enzimática de la lipasa libre *Mucor Miehei*, operando con diferentes concentraciones de lipasas, en condiciones estandar: con 12 mL aceite de girasol, 3.5 mL EtOH, 12.5 µl NaOH 10 N, operando a 30 °C, con agitación 300 rpm y un tiempo de reacción de 2 horas.

Cantidad (g)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0,005	11,87	25,34	20,19
0,010	11,52	28,84	21,53
0,015	10,78	30,93	22,14
0,020	10,50	31,42	24,89

Los estudios realizados ponen de manifiesto que la temperatura óptima de operación, según la Tabla 3.5, es de 30 °C. Las relaciones aceite/etanol más adecuadas se corresponden con la relación en volumen 12/3.5 (mL/mL), correspondientes a una relación molar 1/6 (Tabla 3.6). La disminución continua de la viscosidad se debe al aumento de la proporción de etanol, que reduce la viscosidad.

De la Tabla 3.7 podemos deducir que con un aumento significativo de la cantidad de lipasa utilizada se reduce la viscosidad y se aumenta la conversión, pero en un porcentaje muy reducido, por lo que su utilización en mayor cantidad de 0.01 g no resulta ventajoso.

Dado el precio elevado de esta lipasa, su aplicación práctica solo sería viable tras su inmovilización, que permitiese su reutilización, con la consiguiente reducción del costo del proceso. Para ello, se ha investigado el sistema AlPO_4 /Sepiolita activado con p-hidroxibenzaldehído, que según el esquema general presentado en la Figura 2.12, permitiría la inmovilización de las lipasas a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, generando una unión covalente.

También se ha ensayado la inmovilización por adsorción física de las lipasas en un sistema poroso. Se ha utilizado una lipasa desmineralizada como soporte de la lipasa [260,272], frente a la producción de biodiesel mediante la transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto.

Para la inmovilización de la enzima se sigue la metodología descrita [271], poniendo en contacto en el matraz de reacción 6 mL de EtOH absoluto, 0.5 g de sólido, 0.04 g de lipasa (*Mucor Miehei* de sigma aldrich). Como soporte para la inmovilización covalente se emplea AlPO_4 /Sepiolita activado con p-hidroxibenzaldehído y para la inmovilización por adsorción física se emplea Sepiolita desmineralizada, de Tolsa S.A, Vallecas-Madrid. La mezcla se mantiene con agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente, después se guarda en el frigorífico a 4 °C, durante 24 horas. Al día siguiente se separa el sobrenadante del soporte.

El sólido que contiene la enzima inmovilizada es separado por centrifugación, y el filtrado resultante es separado también para determinar la cantidad de lipasa que permanece en la disolución sobrenadante. La actividad catalítica de esta disolución es proporcional a la cantidad de enzima disuelta en la misma, por lo que se puede determinar así la cantidad de lipasa que no ha sido inmovilizada. La comparación de este valor con la actividad de la enzima inmovilizada y libre permite determinar la cantidad de enzima inmovilizada, y la eficiencia del proceso. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Rendimiento de la lipasa *Mucor Miehei* soportada: 12 mL aceite/ 3.5 mL EtOH, temperatura de 30 °C, 12.5 µl NaOH 10 N, agitación de 300 rpm, durante 2 h.

Biocatalizador	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
AlPO₄/Sepiolita activado con p-hidroxibenzaldehído	16,23	-	-
Sobrenadante	15,58	12,04	8,10
Sepiolita desmineralizada	18,07	-	-
Sobrenadante	14,68	14,47	10,63

Como podemos ver en la Tabla 3.8 ningún soporte mejora los resultados obtenidos con la lipasa en forma libre.

3.2.3. Influencia de los diferentes parámetros de reacción en la actividad de la lipasa inmovilizada comercial *Rhizomucor miehei*

Una vez establecida la viabilidad de la lipasa inmovilizada comercial *Rhizomucor miehei* de Novozyme en el proceso de etanolisis selectiva de triglicéridos, operando en los niveles de la fuerza iónica según los datos de la Tabla 3.4. De acuerdo con estos resultados, y dada la influencia que ejerce la presencia de una pequeña cantidad de disolución acuosa de NaOH 10N, se procede a la optimización de los diferentes parámetros de reacción: temperatura, relación molar aceite/etanol absoluto y cantidad de lipasa, en relación a la cantidad de disolución acuosa de NaOH 10N, idóneos para efectuar el proceso de etanolisis selectiva enzimática.

Así, a fin de optimizar la temperatura de reacción idónea (estudios recogidos en las Tablas 3.2 y 3.4 en los que se operó a 30 °C), se han completado operando a 35 y 40 °C, bajo las mismas condiciones experimentales, variando la cantidad de disolución acuosa NaOH 10N presente en la reacción. En paralelo, se han comparado los resultados obtenidos entre reacciones en blanco (sin lipasa) y con lipasa en las mismas condiciones, para determinar el grado de influencia de la lipasa en el resultado de la reacción. Los resultados obtenidos operando a 35 °C, en idénticas condiciones experimentales que las indicadas en la Tabla 3.2, en blanco (sin lipasas) se recogen en las Tablas 3.9 y en la Tabla 3.10, se muestran los resultados

obtenidos operando en presencia de lipasas, bajo las condiciones experimentales de la Tabla 3.4. La comparación de la reacción con blanco y con lipasa se muestra en la Figura 3.3. El comportamiento obtenido es similar al que se produce a 30 °C.

Así, en la Figura 3.2 se puede ver cómo influye la cantidad de NaOH 10N a la reacción con lipasa en comparación con el blanco. En la reacción a 30 °C, sin ninguna cantidad de NaOH 10N la reacción con lipasa muestra peor valor de viscosidad frente a la reacción sin lipasa, lo que se puede deber a que la lipasa sin adición de NaOH 10N es completamente inactiva frente a la reacción de transesterificación.

También se puede ver que en las siguientes adiciones de NaOH 10N tanto el blanco como en la reacción con lipasa, la viscosidad disminuye progresivamente, siendo el efecto que se produce en la reacción con lipasa mayor que en la reacción sin lipasa.

Un comportamiento similar se obtiene con las reacciones realizadas a 35 °C, comparando el blanco (Tabla 3.9) y la reacción con lipasa, Tabla 10, con cantidades crecientes de disolución acuosa NaOH 10N, desde 0 hasta 50 µL. Los resultados de ambas Tabla se muestran gráficamente en la Figura 3.3.

Tabla 3.9. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite, 3.5 mL EtOH, temperatura de 35 °C, agitación de 300 rpm, durante 2 h, para la etanolisis del aceite de girasol, en ausencia de lipasas (blanco), en diferentes medios.

NaOH 10N (µL)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	16,19	-	-
12,5	10,44	40,02	22,53
25	9,08	71,51	69,53
37,5	9,37	70,18	69,23
50	8,15	75,28	55,79

Tabla 3.10. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite girasol, 3.5 mL EtOH absoluto, temperatura de 35°C, con cantidades crecientes de disolución acuosa NaOH 10N, con 40mg de lipasa *Rhizomucor miehei* de Novozyme y agitación de 300 rpm durante 2h.

NaOH 10N (μ l)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	16,80	-	-
12,5	10,22	41,77	21,98
25	8,15	74,58	40,35
37,5	8,44	75,07	69,53
50	9,65	65,79	55,08

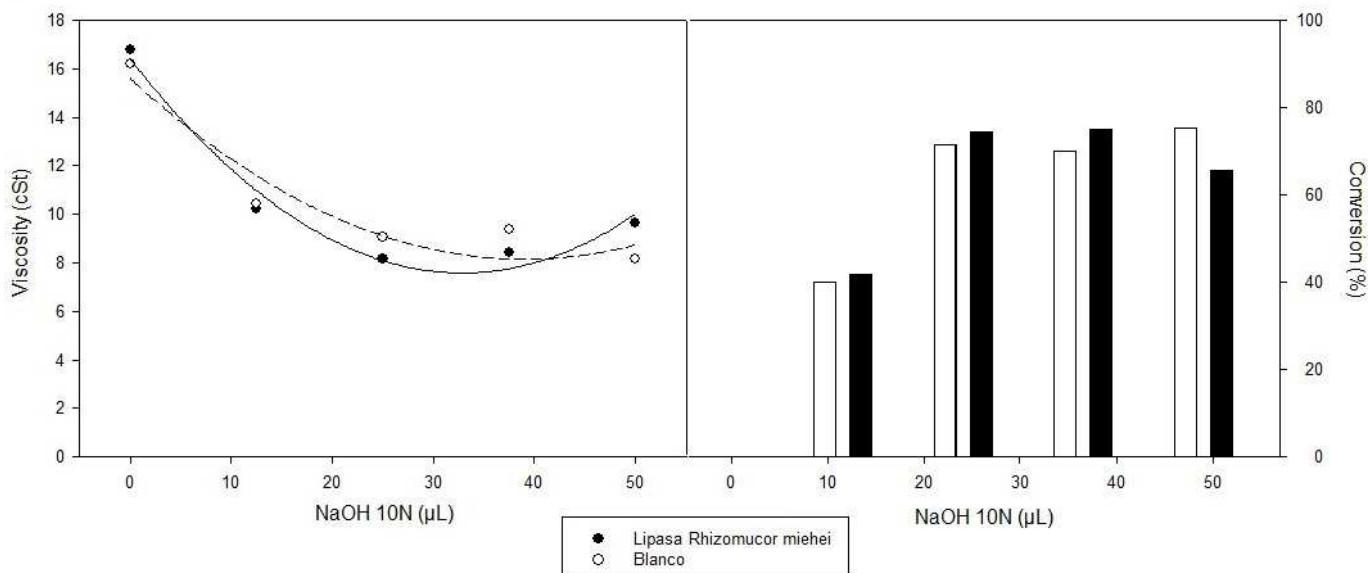


Figura 3.3. Variación de la viscosidad de los productos de reacción obtenidos operando a 35 °C con la lipasa inmovilizada *Rhizomucor miehei* de Novozyme (●), frente al blanco (○), operando en un medio con diferentes cantidades de una disolución acuosa NaOH 10N, según los datos recogidos en las Tablas 3.9, y 3.10.

En la Figura 3.3 se puede ver cómo influye la cantidad de NaOH 10N a la reacción con lipasa en comparación con el blanco. Al igual que a 30 °C, la reacción a 35 °C sin ninguna cantidad de NaOH 10N y con lipasa, muestra peor valor de viscosidad frente a la reacción sin lipasa, aunque en un grado casi despreciable.

También se puede ver que en las siguientes adiciones de NaOH 10N tanto en el blanco como en la reacción con lipasa, se disminuye la viscosidad, pero a diferencia de las reacciones a 30 °C, en la adición de 50 µL de Na OH 10N, la reacción sin lipasa tiene menor viscosidad que con lipasa. Es decir, a 35 °C se identifica un valor óptimo de 40 µL de disolución acuosa de NaOH 10N, para conseguir la mayor conversión y mejor viscosidad, que a 30 °C se sitúa en 50 µL.

Al operar a 40 °C, se obtiene la inactivación de la lipasa, al mostrar una actividad igual o inferior al blanco, como puede observarse en los valores recogidos en las Tablas 3.11 y 3.12, así como en la Figura 3.4.

Tabla 3.11. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite, 3.5 mL EtOH, temperatura de 40 °C, agitación mayor de 300 rpm, durante 2 h, para la etanolisis del aceite de girasol, en ausencia de lipasas (blanco), en diferentes medios.

NaOH 10N (µL)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	14,81	35,59	5,59
12,5	10,34	42,67	20,81
25	9,33	73,88	40,51
37,5	9,62	62,79	55,78
50	8,76	75,87	68,93
62,5	9,13	75,46	60,94
75	10,22	50,83	50,83

Tabla 3.12. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite girasol, 3.5 mL EtOH absoluto, temperatura de 40°C, con cantidades crecientes de disolución acuosa NaOH 10N, con 40mg de lipasa *Rhizomucor miehei* de Novozyme y agitación de 300 rpm durante 2h.

NaOH 10N (μ l)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0	15,11	-	-
12,5	11,97	29,31	14,35
25	11,32	34,18	19,27
37,5	10,10	35,45	26,18
50	9,11	56,37	36,37
62,5	11,69	75,00	50,76
75	11,32	50,71	48,26

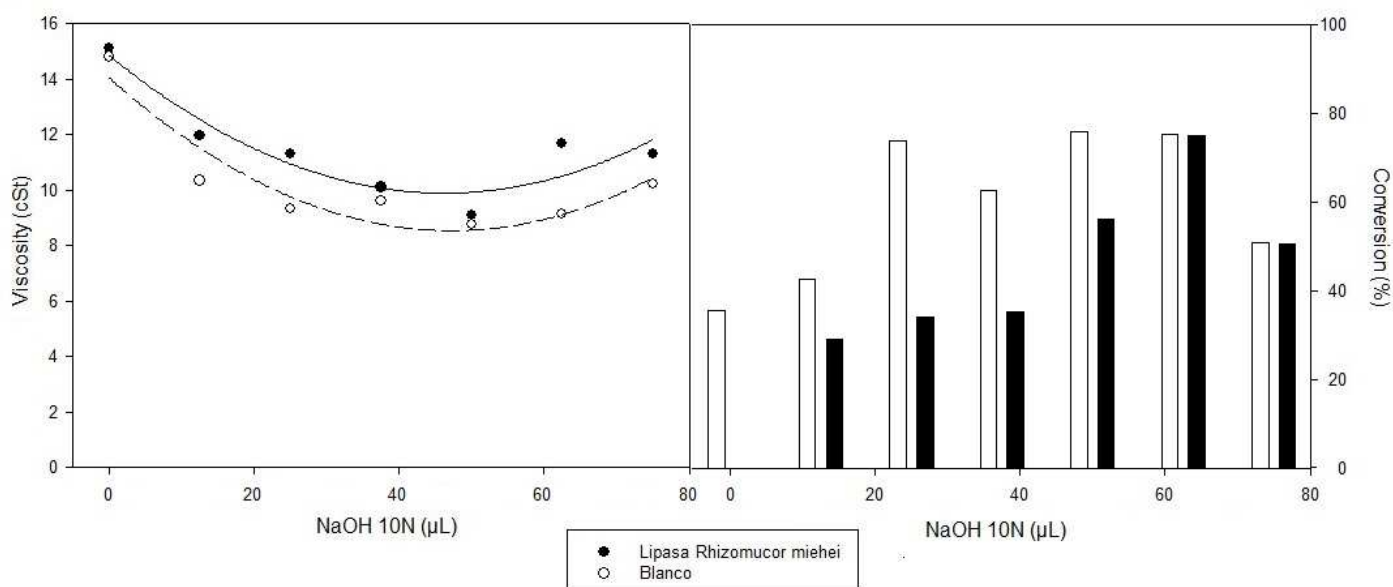


Figura 3.4. Variación de la viscosidad y conversión de los productos de reacción obtenidos operando a 40 °C con la lipasa inmovilizada *Rhizomucor miehei* de Novozyme (●), frente al blanco (○), operando en un medio con diferentes cantidades de una disolución acuosa NaOH 10N, según los datos recogidos en las Tablas 3.11, y 3.12.

La influencia de la cantidad de lipasa en el medio de reacción se ha evaluado realizando una serie de reacciones con cantidades de lipasa comprendidas entre 0.001 hasta 0.05 g (Tabla 3.13 y Figura 3.5), operando en las condiciones óptimas de temperatura y fuerza iónica.

Tabla 3.13. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite girasol, con 3.5 mL EtOH, temperatura de 35 °C, con 25 µl de NaOH 10N, con cantidades variables de lipasa *Rhizomucor miehei* y agitación de 300 rpm durante 2h.

Peso (g)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
0,001	9,65	86,3	61,4
0,0025	9,13	74,3	57,8
0,005	7,95	99,6	63,7
0,010	7,91	100	62,4
0,020	8,11	91,9	63,8
0,030	8,33	76,0	61,6
0,040	8,15	97,1	62,4
0,050	9,51	67,1	52,4

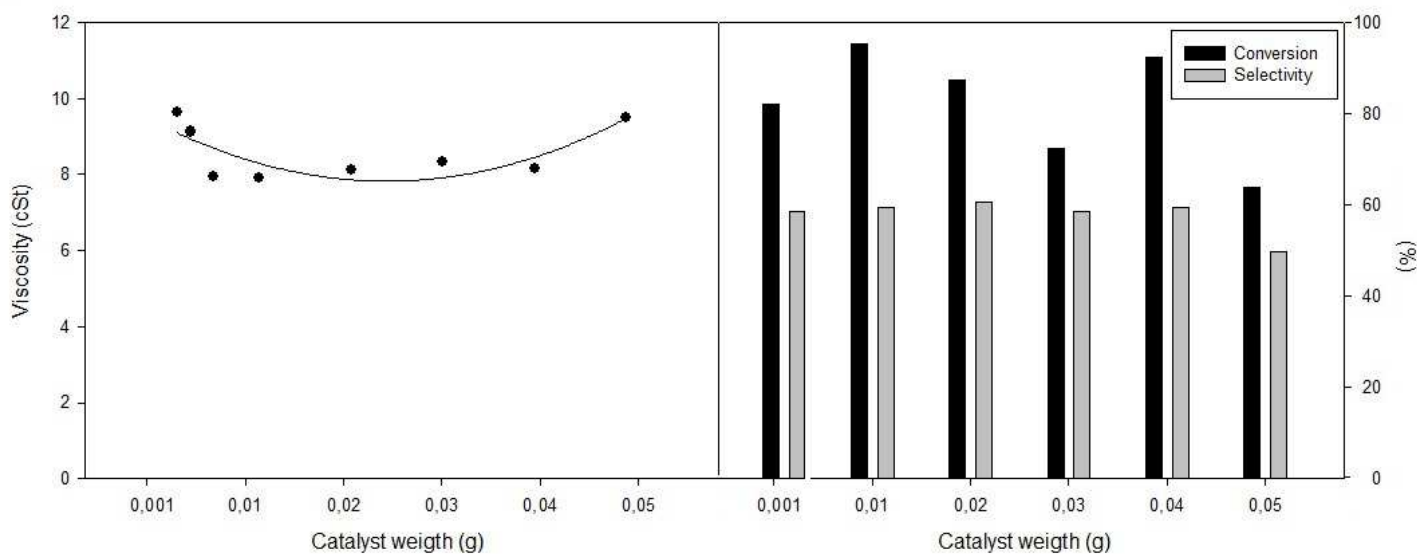


Figura 3.5. Representación de la influencia de la cantidad de lipasa en la viscosidad, conversión y selectividad en las condiciones estándar, recogidas en la Tabla 3.13.

Como se puede ver en la Figura 3.5, a partir de una cantidad de lipasa de 0.005 g no se mejora la viscosidad de la reacción, manteniéndose bastante similar la selectividad de la reacción y en niveles considerados de buen rendimiento. Por tanto, al emplear cantidades superiores a 0.005-0.01 g, en las condiciones investigadas, se obtiene el control cinético por la

difusión de los reactivos, por lo que no es aconsejable operar con cantidades superiores de lipasa, ya que no repercuten en un aumento del rendimiento del proceso.

Una vez optimizados los parámetros de temperatura, la cantidad de NaOH 10N, y la cantidad de lipasa en el medio de reacción, se estudia la influencia de la relación molar aceite/etanol absoluto, comprendida en el intervalo de 1/4 hasta 1/8 (cantidades en volumen de 2.2 a 4.7 mL de etanol absoluto, usando siempre 12 mL de aceite de girasol), como se muestra en la Tabla 3.14 y Figura 3.6.

Tabla 3.14. Condiciones de reacción estándar: 12 mL aceite girasol, con 10mg de lipasa *Rhizomucor miehei*, temperatura de 35 °C, con 25 µl de NaOH 10N, con cantidades variables de EtOH absoluto y con agitación de 300 rpm durante 2h.

Relación Molar (mol/mol)	Relación Volumétrica (mL/mL)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
(1/4)	2,3	13,06	90,2	38,1
(1/5)	2,9	9,49	97,4	50,0
(1/6)	3,5	7,91	100	62,4
(1/7)	4,1	7,15	100	69,3
(1/8)	4,7	6,12	100	73,2

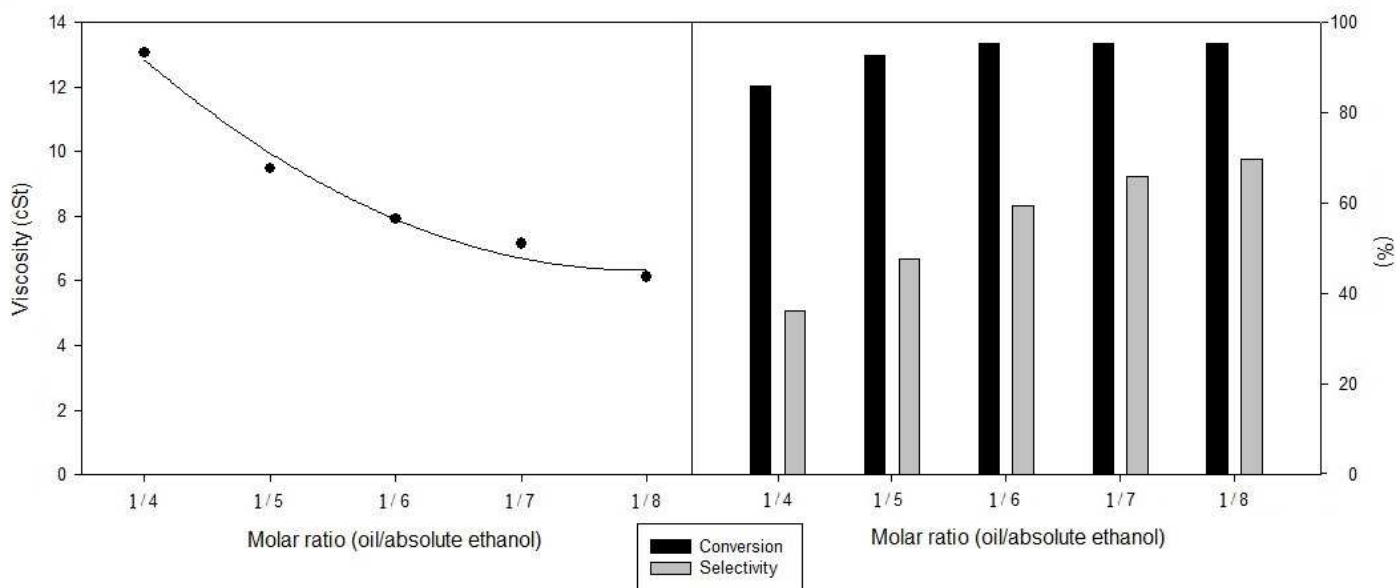


Figura 3.6. Representación de la influencia de la cantidad de lipasa en la viscosidad, conversión y selectividad en las condiciones estándar, recogidas en la Tabla 3.14.

Como se puede ver en la Figura 3.6, la conversión, pero sobre todo la selectividad y la viscosidad está directamente relacionada con la cantidad de etanol absoluto utilizado en la reacción, es decir, al aumentar la selectividad del proceso (aumento de la proporción de FAEE y MG) se produce una disminución de la viscosidad, ya que esta está directamente relacionada a la concentración de triglicéridos.

3.2.4. Estudio de la inmovilización física de la lipasa inmovilizada comercial *Rhizomucor miehei*.

La lipasa *Rhizomucor miehei* de Novozyme inmovilizada sobre un soporte polimérico se ha comprobado como muy eficiente en la reacción de transesterificación de aceite de girasol para la obtención del combustible denominado “Ecodiesel”, que integra la glicerina como monoglicérido [340]. El punto débil respecto a su aplicabilidad en este proceo viene asociado a la necesidad de centrifugación de la reacción para separar la lipasa y poder reutilizarla. En estas condiciones se ha logrado reutilizarla seis veces [340]. En este sentido se ha evaluado la posibilidad de evitar la necesidad de centrifugación para recuperar la lipasa, mediante su inmovilización en soportes inorgánicos.

Para la inmovilización física se han utilizado diferentes soportes, que debido a sus diferentes densidades, se aplican en diferentes cantidades, a fin de presentar volúmenes similares: 1 g de sepiolita desmineralizada, 0.2 g de silicagel, 0.2 g de AlPO_4 /Sepiolita activado con 4-aminobencilamina y 0.2 g de AlPO_4 /Sepiolita activado con p-hidroxibenzaldehído, como se muestra en la Figura 3.7.



Figura 3.7. Soportes empleados para la inmovilización de la lipasa *Rhizomucor miehei* de Novozyme, ya fijada a un polímero (a) sepiolita desmineralizada, (b) silicagel, (c) AlPO_4 /Sepiolita activado con 4-aminobencilamina y (d) AlPO_4 /Sepiolita activado con p-hidroxibenzaldehído.

En todos los casos se siguió el mismo procedimiento experimental, la inmovilización, física o covalente según el soporte empleado, se lleva a cabo mediante la mezcla del soporte y 0.01 g de la lipasa RM con 3.5 mL de etanol absoluto agitando durante 30 min a 700 rpm, con una temperatura de 35 °C, temperatura que después se usará en la reacción de etanolisis selectiva.

A continuación se lleva a cabo la reacción de etanolisis, completando los reactivos necesarios para obtener las condiciones estándar determinadas en el estudio previo, 12 mL de aceite de girasol, 25 μl de disolución acuosa NaOH 10N, 0.01 g de lipasa, con un tiempo de reacción de 2h y una agitación de 700 rpm. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15. Reacciones de etanolisis parcial con la lipasa RM inmovilizada en diferentes soportes inorgánicos. Las condiciones estándar de la reacción son 12 mL de aceite de girasol, 3.5 mL de etanol absoluto, a temperatura de 35 °C, 25 µl de disolución acuosa NaOH 10N, 0.01 g de lipasa y diferentes cantidades de soporte, con una duración de 2h y una agitación de 700 rpm.

Soporte	Cantidad (g)	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
Sepiolita desmineralizada	1	18,75	-	-
Silicagel	0,2	11,56	83.0	31.4
AlPO₄/Sepiolita 4-aminobencilamina	0,2	23,66	-	-
AlPO₄/Sepiolita p-hidroxibenzaldehído	0,2	16,19	-	-

En todos los casos, con la excepción de la Silica gel, la inmovilización con soportes inorgánicos produce la desactivación completa de la lipasa, ya que se mantienen las dos fases iniciales de la mezcla de reacción (el aceite y el etanol), señal inequívoca de inactividad en la reacción. Es decir, ninguno de los soportes investigados: sepiolita desmineralizada, AlPO₄/Sepiolita activado con 4-aminobencilamina y AlPO₄/Sepiolita activado con p-hidroxibenzaldehído, no sólo no aportan ventaja alguna sino que desactivan la lipasa comercial *Rhizomucor miehei*. Por el contrario, sí se han obtenido buenos resultados con el sistema soportado de *Rhizomucor miehei* en la Silica gel.

La principal ventaja de la aplicación del sistema *Rhizomucor miehei* de Novozyme inmovilizado con silica gel está en facilitar su separación del sistema heterogéneo en el que operan. Es decir, la baja densidad del biocatalizador *Rhizomucor miehei* de Novozyme (se trata de un soporte polimérico) dificulta su separación para realizar una nueva reacción, teniendo que recurrirse a la centrifugación. Tras su inmovilización con el soporte inorgánico a base de Silica gel, se consigue una fácil separación, por simple decantación durante media hora. En la Tabla 3.16 y en la Figura 3.8 se recogen los resultados obtenidos con la reutilización de este biocatalizador heterogeneizado.

Tabla 3.16. Resultados obtenidos tras el uso sucesivo o reutilización de la lipasa *Rhizomucor miehei* soportada en Silica gel (0.01 g de lipasa en 0.2 de Silica gel), operando con las mismas condiciones estándar del primer uso y añadiendo en cada reacción 12 mL de aceite de girasol, a una temperatura de 35 °C, 3.5 mL de etanol absoluto y 25 µl de disolución acuosa NaOH 10N, una agitación de 700 rpm y tiempo de reacción de 2h.

Nº uso	Viscosidad (cSt)	Conv. (%)	Sel. (%)
1	11,56	73,0	31,4
2	10,26	80,4	64,1
3	10,02	70,1	56,1
4	9,94	60,1	33,6
5	10,14	54,6	55,6
6	10,27	60,7	57,7
7	10,83	61,0	28,0
8	10,87	50,0	39,6
9	11,36	50,5	37,8
10	10,67	66,9	51,1
11	10,47	51,6	44,7
12	10,46	64,5	41,5
13	10,71	74,1	50,0
14	9,33	71,2	59,7
15	11,15	70,0	34,8

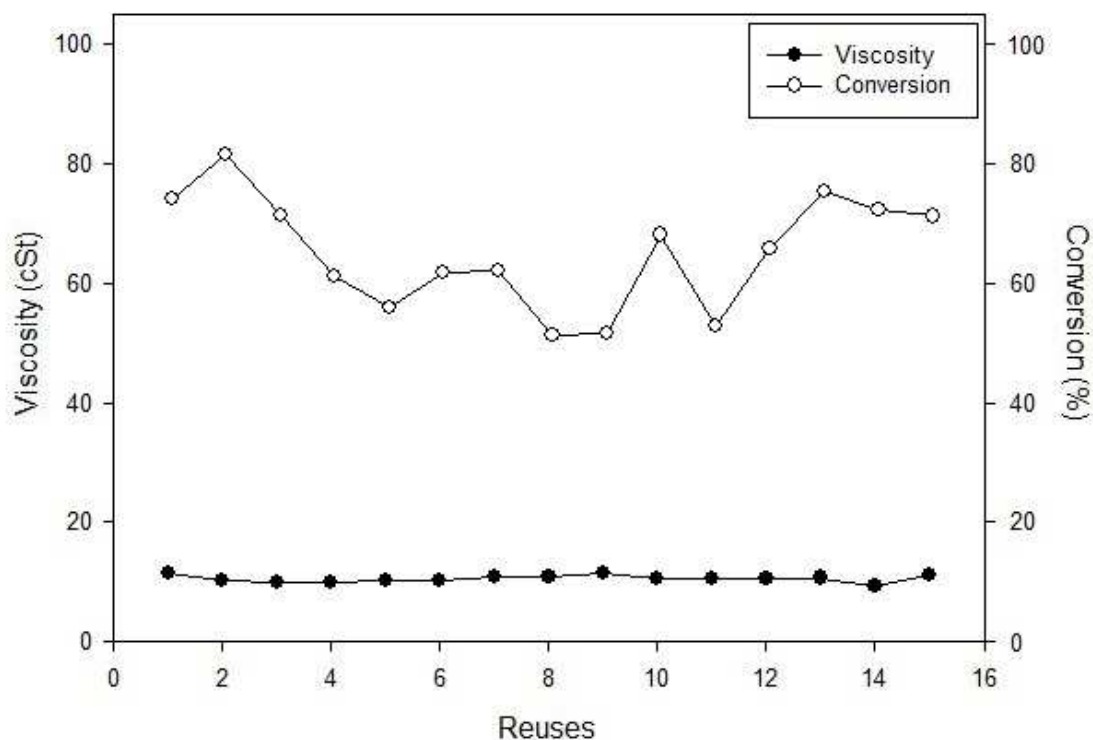


Figura 3.8. Reutilización de la lipasa *Rhizomucor miehei* soportada en Silica gel con las condiciones estándar.

Los resultados obtenidos con la inmovilización en un soporte inorgánico del sistema estabilizado de la lipasa comercial *Rhizomucor miehei* sobre un soporte polimérico, son muy alentadores, ya que se ha demostrado que el sistema permanece estable tras su reuso de al menos 15 veces, como se muestra en la Tabla 3.16, y gráficamente en la Figura 3.8. Lo que no significa que no pueda ser un número muy superior. Por el contrario, según los resultados previamente obtenidos, usando bajo idénticas condiciones experimentales la lipasa RM comercial sin inmovilizar, se consiguieron obtener sólo seis reusos [340], por lo que se puede considerar que con la simple inmovilización por retención física se ha aumentado considerablemente su eficiencia. De hecho, tras 15 reutilizaciones (Figura 3.8) no se percibe ningún deterioro en el funcionamiento del sistema enzimático, lo que permite suponer que es posible realizar un número mucho mayor de reusos.

3.2.5. Análisis de multivarianza ANOVA

Se ha realizado un diseño experimental factorial multinivel con la finalidad de analizar la influencia del peso de lipasa, la relación aceite/etanol absoluto y la cantidad de NaOH 10N, así como la magnitud de esta influencia en la reacción de etanolisis parcial. Para ello se han fijado unos límites a cada variable y se ha estudiado el efecto de las variables en la viscosidad cinemática de la mezcla final.

Los intervalos estudiados son: para el peso de lipasa, desde 0.01 hasta 0.03g, la relación volumétrica aceite/etanol absoluto entre 12/2.9 a 12/3.5 en mL/mL (lo que equivale a relaciones molares de 1/4 a 1/6 aproximadamente) y la cantidad de NaOH 10N entre 25 y 50 μ L. Se ha fijado una cantidad de soporte sílica gel en 0.2 g, que durante 20 minutos se agita con la cantidad seleccionada de lipasa RM de Novozyme, y el etanol absoluto empleado. Todas las reacciones del diseño experimental se han efectuado con una agitación constante de 700 rpm.

En la Tabla 3.17 se muestran los parámetros analizados en el diseño experimental, así como los valores usados como códigos en las matrices del análisis y sus correspondientes valores reales. Cada experimento se ha realizado por duplicado para asegurar la reproducibilidad de cada reacción y mejorar así el modelo.

Tabla 3.17. Parámetros analizados en el diseño factorial: códigos utilizados y valores reales.

Variables	Unidad	Niveles		
		-1	0	1
Peso	g	0.01	0.02	0.03
Aceite/EtOH abs.	mL/mL	12/2.9	-	12/3.5
NaOH 10N	μ L	25	37.5	50

El diseño realizado consta de 18 experimentos (*runs*) que son llevados a cabo por duplicado y en forma aleatoria para minimizar posibles errores. La secuencia de experimentos a realizar se muestra en la Tabla 3.18.

Una vez realizados los 36 experimentos correspondientes al diseño propuesto y obtenidos los valores de viscosidad cinemática para cada reacción efectuada, se completó el mismo diseño

con los datos experimentales (variables respuesta) y se realizó el análisis de los datos con el software Statgraphics® en su versión XVI centurion, el cual se vale de la aplicación de un método de análisis multivariable (ANOVA) para establecer las relaciones entre las variables en estudio.

Tabla 3.18. Matriz de experimentos del diseño factorial y las respuestas obtenidas para la selectividad y la viscosidad.

Run	Variables estudiadas			Variables de salida	
	Peso (g)	Aceite/EtOH (mL/mL)	NaOH 10N (μ L)	Viscosidad (cSt)	Selectividad (%)
1	1	-1	0	11,36	39,7
2	1	1	-1	10,16	50,1
3	-1	1	1	9,98	67,9
4	0	1	-1	9,88	49,8
5	-1	-1	0	11,48	45,3
6	1	-1	1	11,56	47,6
7	-1	1	-1	10,56	51,4
8	-1	1	0	9,09	55,2
9	0	-1	-1	11,84	40,7
10	0	-1	0	11,52	41,1
11	0	1	1	8,92	69,8
12	1	1	0	10,14	51,6
13	-1	-1	1	10,82	52,7
14	0	1	0	9,31	56,2
15	0	-1	1	9,98	48,7
16	1	1	1	9,86	67,1
17	1	-1	-1	11,64	35,1
18	-1	-1	-1	12,29	43,2

Repetición de experimentos				Viscosidad (cSt)	Selectividad (%)
Run	Peso (g)	Aceite/EtOH (mL/mL)	NaOH 10N (μ L)		
19	1	1	1	9,94	58,7
20	0	-1	1	9,94	53,1
21	1	-1	1	11,09	44,4
22	-1	1	1	10,18	64,5
23	1	-1	-1	12,21	34,5
24	-1	1	0	10,01	60,5
25	-1	-1	0	11,52	45,7
26	-1	1	-1	10,01	54,7
27	0	1	-1	8,89	56,6
28	-1	-1	-1	11,56	36,8
29	0	1	1	9,53	61,8
30	0	1	0	9,73	59,7
31	0	-1	0	10,44	44,3
32	1	1	0	10,88	54,3
33	0	-1	-1	11,26	33,2
34	1	-1	0	11,48	37,4
35	-1	-1	1	10,26	50,2
36	1	1	-1	10,03	50,1

- **Resultados para viscosidad cinemática.**

Se ha estudiado la influencia de los principales parámetros de reacción en la viscosidad cinemática del biocombustible obtenido. Para ello se han realizado una serie de 18 experimentos (realizados por duplicado) siguiendo un diseño experimental multifactorial, que mediante un análisis de la varianza, permitirá obtener la relación entre los principales parámetros de reacción (cantidad de lipasa, relación aceite/etanol y cantidad de disolución acuosa NaOH 10N) y la variable de salida Viscosidad cinemática.

En la Tabla 3.19 se muestran los resultados del análisis donde se pueden observar los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación.

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio (Tabla 3.20).

Tabla 3.19. Efectos estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

<i>Effect</i>	<i>Estimate</i>	<i>Stnd. Error</i>	<i>V.I.F.</i>
average	10.1458	0.156395	
A:Amount RM	0.215833	0.171323	1.0
B:Ratio Ethanol	-1.39722	0.139884	1.0
C:NaOH 10N	-0.689167	0.171323	1.0
AA	1.3025	0.296739	1.0
AB	-0.0191667	0.171323	1.0
AC	0.19875	0.209826	1.0
BC	0.5025	0.171323	1.0
CC	-0.1275	0.296739	1.0
block	-0.0794444	0.139884	1.0

Standard errors are based on total error with 26 d.f.

Tabla 3.20. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Amount RM	0.279504	1	0.279504	1.59	0.2189
B:Ratio Ethanol	17.5701	1	17.5701	99.77	0.0000
C:NaOH 10N	2.8497	1	2.8497	16.18	0.0004
AA	3.39301	1	3.39301	19.27	0.0002
AB	0.00220417	1	0.00220417	0.01	0.9118
AC	0.158006	1	0.158006	0.90	0.3523
BC	1.51504	1	1.51504	8.60	0.0069
CC	0.0325125	1	0.0325125	0.18	0.6710
blocks	0.0568028	1	0.0568028	0.32	0.5750
Total error	4.57882	26	0.176109		
Total (corr.)	30.4357	35			

R-squared = **93.6491**percent

R-squared (adjusted for d.f.) = **91.7673**percent

Standard Error of Est. = **2.84247**

Mean absolute error = **2.07168**

Durbin-Watson statistic = 2.39078 (P=0.8474)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.19851

A continuación se muestra la Tabla 3.21, donde se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.21. Coeficientes de regresión para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Coefficient	Estimate
constant	10.1458
A:Amount RM	0.107917
B:Ratio Ethanol	-0.698611
C:NaOH 10N	-0.344583
AA	0.65125
AB	-0.00958333
AC	0.099375
BC	0.25125
CC	-0.06375

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Viscosity} = 10.1458 + 0.107917*A - 0.698611*R - 0.344583*N + 0.65125*A^2 - 0.00958333*A*R + 0.099375*A*N + 0.25125*R*N - 0.06375*N^2$$

A: amount RM; R: ratio ethanol; N: NaOH 10N

En la Tabla 3.22 se recogen los valores óptimos de los parámetros para obtener las condiciones concretas en las cuales se reduce la viscosidad al valor mínimo.

Tabla 3.22. Parámetros de los factores para minimizar la viscosidad y valor de la viscosidad.

Valor óptimo	9.27513 cSt		
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Amount RM	-1.0	1.0	-0.151622
Ratio Ethanol	-1.0	1.0	1.0
NaOH 10N	-1.0	1.0	1.0

De acuerdo con los resultados obtenidos las condiciones óptimas de operación serán:

- ✓ Cantidad de Lipasas Rhizomucor miehei: 0,0185g
- ✓ Relación molar aceite metanol 1/6 correspondiente a 12 mL de aceite de girasol y 3.5 mL de etanol absoluto.
- ✓ Cantidad de NaOH 10N: 50 μ L

En la Tabla 3.23 se muestran los valores experimentales obtenidos para cada reacción del diseño experimental para la viscosidad cinemática a 40 °C frente a los valores ajustados por el modelo obtenido, observándose las diferencias entre los valores reales y ajustados según el modelo.

Tabla 3.23. Resultados Estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Row	Observed Value	Fitted Value
1	11.36	11.6529
2	10.16	10.1667
3	9.98	9.7834
4	9.88	9.51653
5	11.48	11.4179
6	11.56	11.0927
7	10.56	10.1688
8	9.09	10.0399
9	11.84	11.4162
10	11.52	10.8842
11	8.92	9.32986
12	10.14	10.2365
13	10.82	10.659
14	9.31	9.48694
15	9.98	10.2246
16	9.86	10.1788
17	11.64	12.0856
18	12.29	12.0494
19	9.94	10.0994

20	9.94	10.1451
21	11.09	11.0133
22	10.18	9.70396
23	12.21	12.0062
24	10.01	9.96042
25	11.52	11.3385
26	10.01	10.0894
27	8.89	9.43708
28	11.56	11.9699
29	9.53	9.25042
30	9.73	9.4075
31	10.44	10.8047
32	10.88	10.1571
33	11.26	11.3368
34	11.48	11.5735
35	10.26	10.5795
36	10.03	10.0873

A continuación se presenta el diagrama de Pareto (Figura 3.9), en el cual se puede observar claramente cuáles son los factores que influyen de manera estadísticamente significativa en la viscosidad. En este caso, la variable más influyente es la relación aceite/etanol, seguida de la cantidad de NaOH 10N y de la cantidad de lipasa (*Rhizomucor miehei* de Novozyme), en orden decreciente de importancia. Es de destacar que sólo la variable cantidad de lipasa tiene una influencia positiva, de modo que al aumentar esta magnitud se produce una disminución en la viscosidad, ya que la finalidad es minimizar la viscosidad.

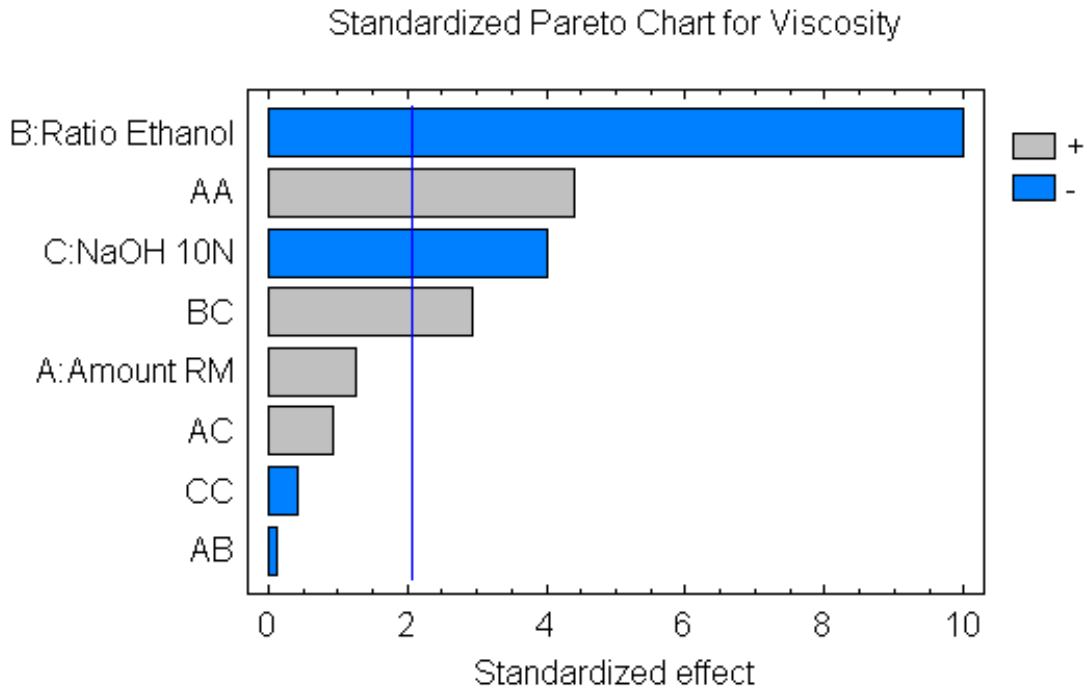


Figura 3.9. Gráfico de Pareto para la viscosidad.

Pueden también observarse en la Figura 3.10, los efectos principales. En este gráfico se deduce fácilmente cómo una pendiente positiva indica un efecto positivo en la conversión, así como un mayor valor de la pendiente indica un efecto más acusado y viceversa. Por tanto se observa aquí y de manera complementaria a la Figura 3.9, cómo la relación aceite/etanol es el parámetro con mayor significancia estadística en la conversión.

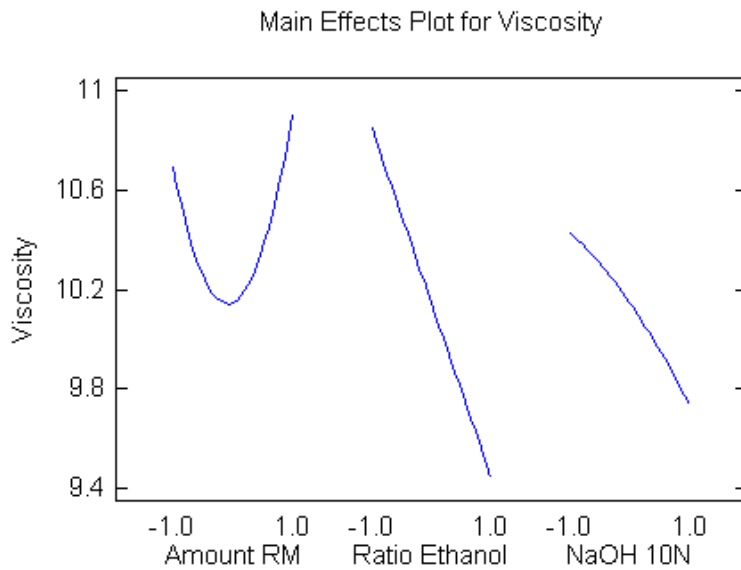


Figura 3.10. Gráfico del efecto de los diferentes factores sobre la viscosidad.

En la Figura 3.11, se muestra la superficie de respuesta obtenida para el modelo estadístico creado para el sistema en estudio y para la variable de salida viscosidad.

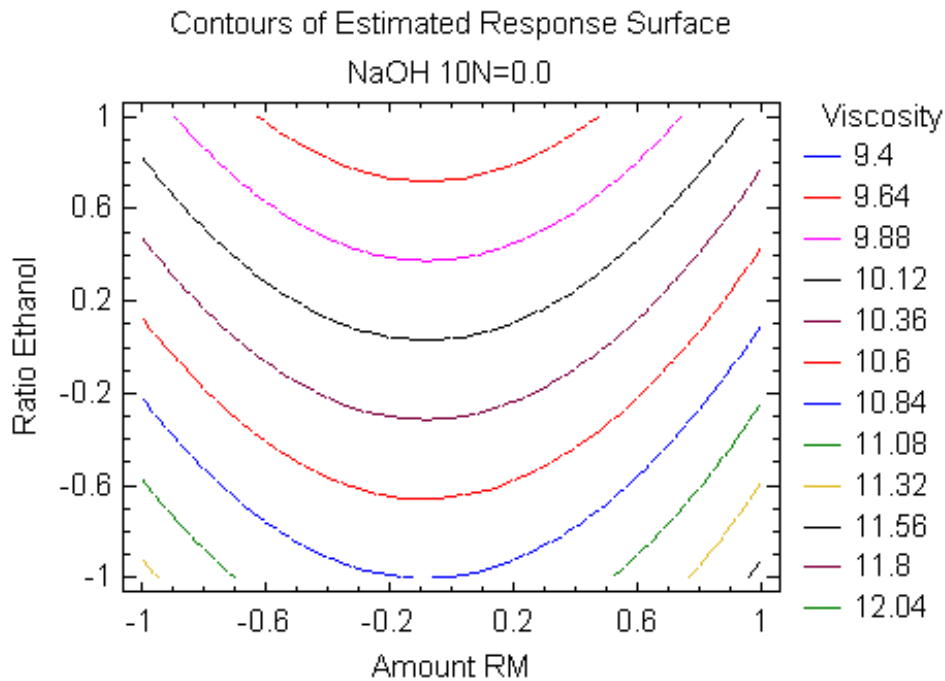
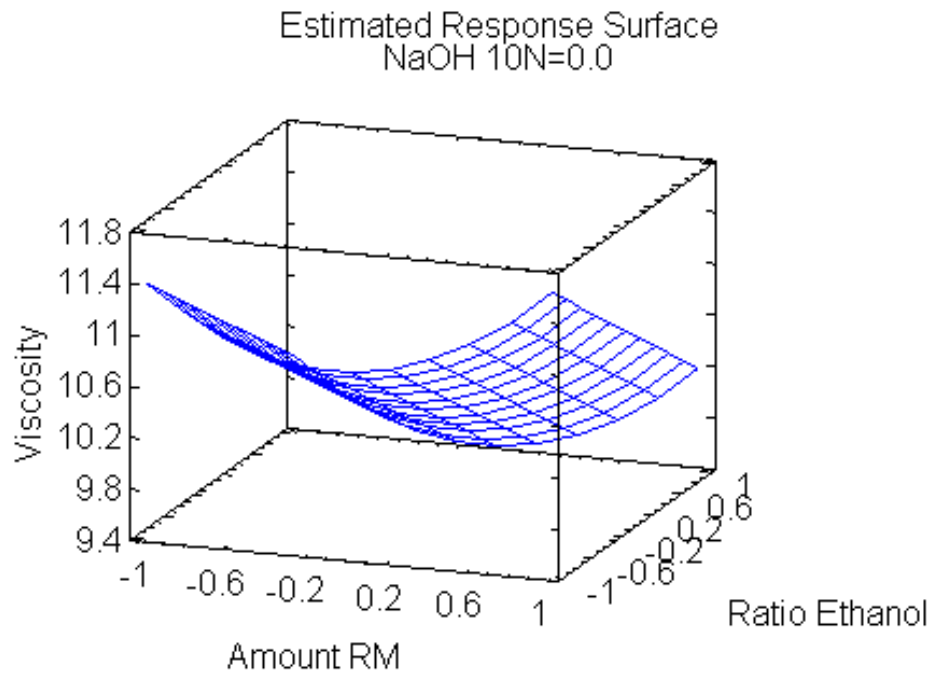


Figura 3.11. Superficie de respuesta estimada con parámetros influyentes como la viscosidad cinemática frente a temperatura y aceite/metanol frente al peso.

El ajuste del modelo es bueno, con unos valores de R^2 del 93.649 %, lo cual indica una buena correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo creado, como puede verse en la Figura 3.12.

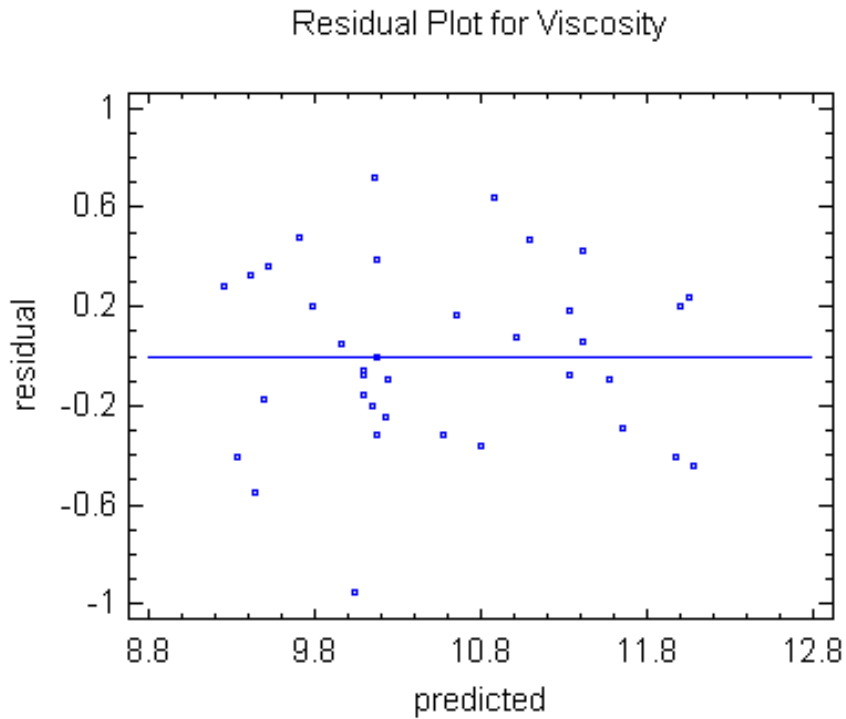


Figura 3.12. Gráfico de probabilidad de la viscosidad.

Por tanto, puede concluirse que el modelo creado para correlacionar las variables de reacción (cantidad de lipasa, relación molar aceite/etanol y cantidad de disolución acuosa NaOH 10N) con la viscosidad es aceptable, ya que es capaz de explicar la variabilidad producida en la viscosidad.

- **Resultados para selectividad.**

Se ha estudiado la influencia de los principales parámetros de reacción en la viscosidad cinemática del biocombustible obtenido. Para ello se han realizado una serie de 18 experimentos (realizados por duplicado) siguiendo un diseño experimental multifactorial, que mediante un análisis de la varianza, permitirá obtener la relación entre los principales parámetros de reacción (cantidad de lipasa, relación aceite/etanol y cantidad de disolución acuosa NaOH 10N) y la variable de salida selectividad.

En la Tabla 3.24 se muestran los resultados del análisis donde se pueden observar los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación.

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio (Tabla 3.25).

Tabla 3.24. Efectos estimados para la variable de salida Selectividad.

<i>Effect</i>	<i>Estimate</i>	<i>Stnd. Error</i>	<i>V.I.F.</i>
average	50.1194	1.05933	
A:Amount RM	-4.79167	1.16043	1.0
B:Ratio Ethanol	14.7944	0.94749	1.0
C:NaOH 10N	12.525	1.16043	1.0
AA	-2.60833	2.00993	1.0
AB	1.075	1.16043	1.0
AC	-0.15	1.42124	1.0
BC	0.325	1.16043	1.0
CC	3.39167	2.00993	1.0
block	-0.705556	0.94749	1.0

Standard errors are based on total error with 26 d.f.

Tabla 3.25. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de salida Selectividad.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Amount RM	137.76	1	137.76	17.05	0.0003
B:Ratio Ethanol	1969.88	1	1969.88	243.81	0.0000
C:NaOH 10N	941.254	1	941.254	116.50	0.0000
AA	13.6068	1	13.6068	1.68	0.2058
AB	6.93375	1	6.93375	0.86	0.3628
AC	0.09	1	0.09	0.01	0.9168
BC	0.63375	1	0.63375	0.08	0.7816
CC	23.0068	1	23.0068	2.85	0.1035
blocks	4.48028	1	4.48028	0.55	0.4632
Total error	210.071	26	8.07964		
Total (corr.)	3307.72	35			

R-squared = **84.9557**percent

R-squared (adjusted for d.f.) = **80.4982**percent

Standard Error of Est. = **0.419653**

Mean absolute error = **0.291921**

Durbin-Watson statistic = 2.12403 (P=0.5720)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.0717421

A continuación se muestra la Tabla 3.26, donde se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.26. Coeficientes de regresión para la variable de salida Selectividad.

<i>Coefficient</i>	<i>Estimate</i>
constant	50.1194
A:Amount RM	-2.39583
B:Ratio Ethanol	7.39722
C:NaOH 10N	6.2625
AA	-1.30417
AB	0.5375
AC	-0.075
BC	0.1625
CC	1.69583

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Selectivity} = 50.1194 - 2.39583*A + 7.39722*R + 6.2625*N - 1.30417*A^2 + 0.5375*A*R - 0.075*A*N + 0.1625*R*N + 1.69583*N^2$$

A: amount RM; R: ratio ethanol; N: NaOH 10N

En la Tabla 3.27 se recogen los valores óptimos de los parámetros para obtener las condiciones concretas en las cuales se reduce la viscosidad al valor mínimo.

Tabla 3.27. Parámetros de los factores para maximizar la selectividad y valor de la selectividad.

Valor óptimo	66.354 %		
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Amount RM	-1.0	1.0	-0.740723
Ratio Ethanol	-1.0	1.0	1.0
NaOH 10N	-1.0	1.0	1.0

De acuerdo con los resultados obtenidos las condiciones óptimas de operación serán:

- ✓ Cantidad de Lipasas Rhizomucor miehei: 0,01259g
- ✓ Relación molar aceite metanol 1/6 correspondiente a 12 mL de aceite de girasol y 3.5 mL de etanol absoluto.
- ✓ Cantidad de NaOH 10N: 50 μ L

En la Tabla 3.28 se muestran los valores experimentales obtenidos para cada reacción del diseño experimental para la selectividad (medida por cromatografía de gases) frente a los valores ajustados por el modelo obtenido, observándose las diferencias entre los valores reales y ajustados según el modelo.

Tabla 3.28. Resultados Estimados para la variable de salida Selectividad.

Row	Observed Value	Fitted Value
1	39.7	38.8375
2	50.1	50.0528
3	67.9	66.6194
4	49.8	53.1403
5	45.3	44.7042
6	47.6	46.5583
7	51.4	53.6194
8	55.2	58.4236
9	40.7	38.6708
10	41.1	43.075
11	69.8	65.9903
12	51.6	54.7069
13	52.7	52.575
14	56.2	57.8694
15	48.7	50.8708
16	67.1	62.7528
17	35.1	34.5083
18	43.2	40.225
19	58.7	62.0472

20	53.1	50.1653
21	44.4	45.8528
22	64.5	65.9139
23	34.5	33.8028
24	60.5	57.7181
25	45.7	43.9986
26	54.7	52.9139
27	56.6	52.4347
28	36.8	39.5194
29	61.8	65.2847
30	59.7	57.1639
31	44.3	42.3694
32	54.3	54.0014
33	33.2	37.9653
34	37.4	38.1319
35	50.2	51.8694
36	50.1	49.3472

A continuación se presenta el diagrama de Pareto (Figura 3.13), en el cual se puede observar claramente cuáles son los factores que influyen de manera estadísticamente significativa en la Selectividad. En este caso, la variable más influyente es la relación aceite/etanol, seguida de la cantidad de disolución acuosa NaOH 10N y de la cantidad de lipasa (*Rhizomucor miehei*), en orden decreciente de importancia. Es de destacar que sólo la variable cantidad de lipasa tiene una influencia positiva, de modo que al aumentar esta magnitud se produce un aumento en la selectividad, ya que la finalidad es maximizar la selectividad.

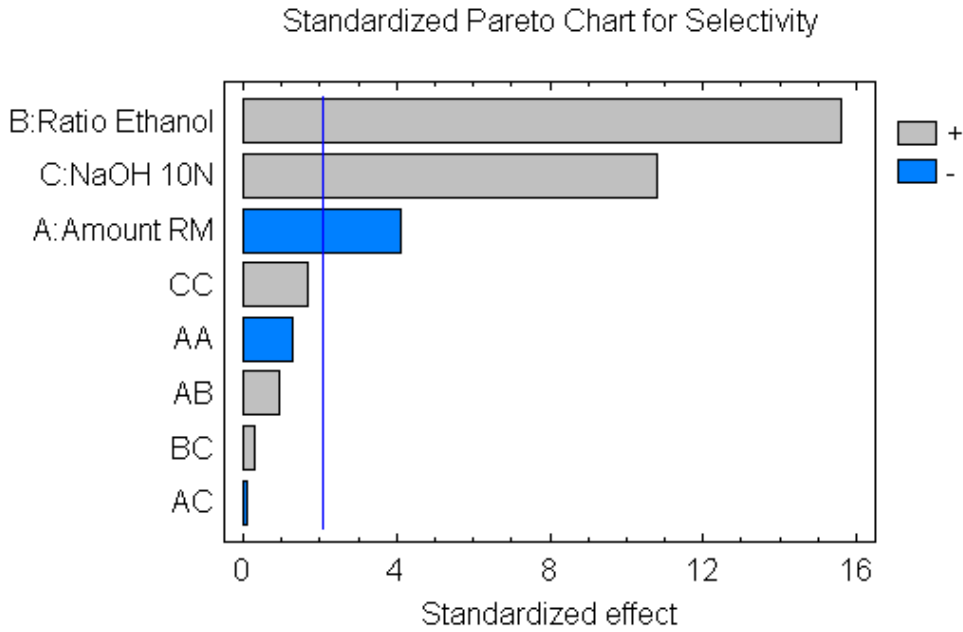


Figura 3.13. Gráfico de Pareto para la selectividad.

Pueden también observarse en la Figura 3.14, los efectos principales. En este gráfico se deduce fácilmente como una pendiente positiva indica un efecto positivo en la conversión, así como un mayor valor de la pendiente indica un efecto más acusado y viceversa. Por tanto se observa aquí y de manera complementaria a la Figura 3.14, como la relación aceite/etanol es el parámetro con mayor significancia estadística en la conversión.

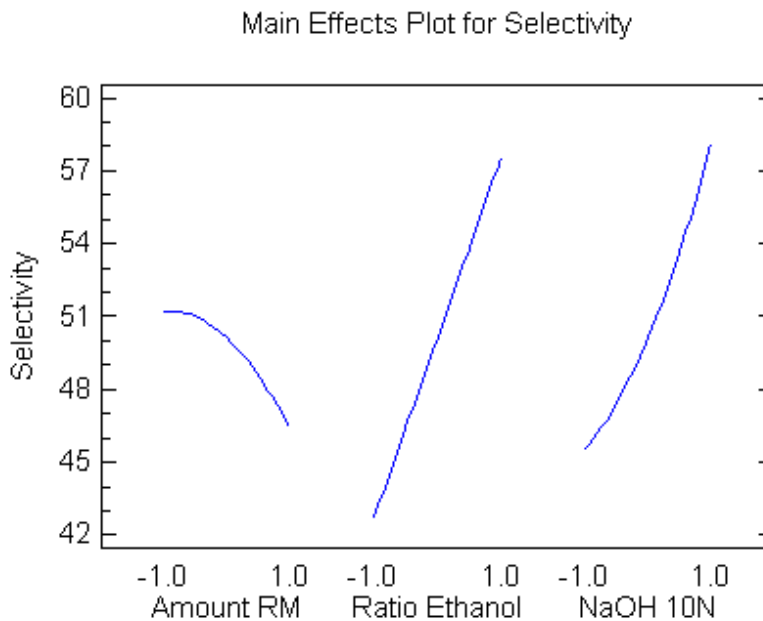


Figura 3.14. Gráfico del efecto de los diferentes factores sobre la selectividad.

En la Figura 3.15, se muestra la superficie de respuesta obtenida para el modelo estadístico creado para el sistema en estudio y para la variable de salida viscosidad.

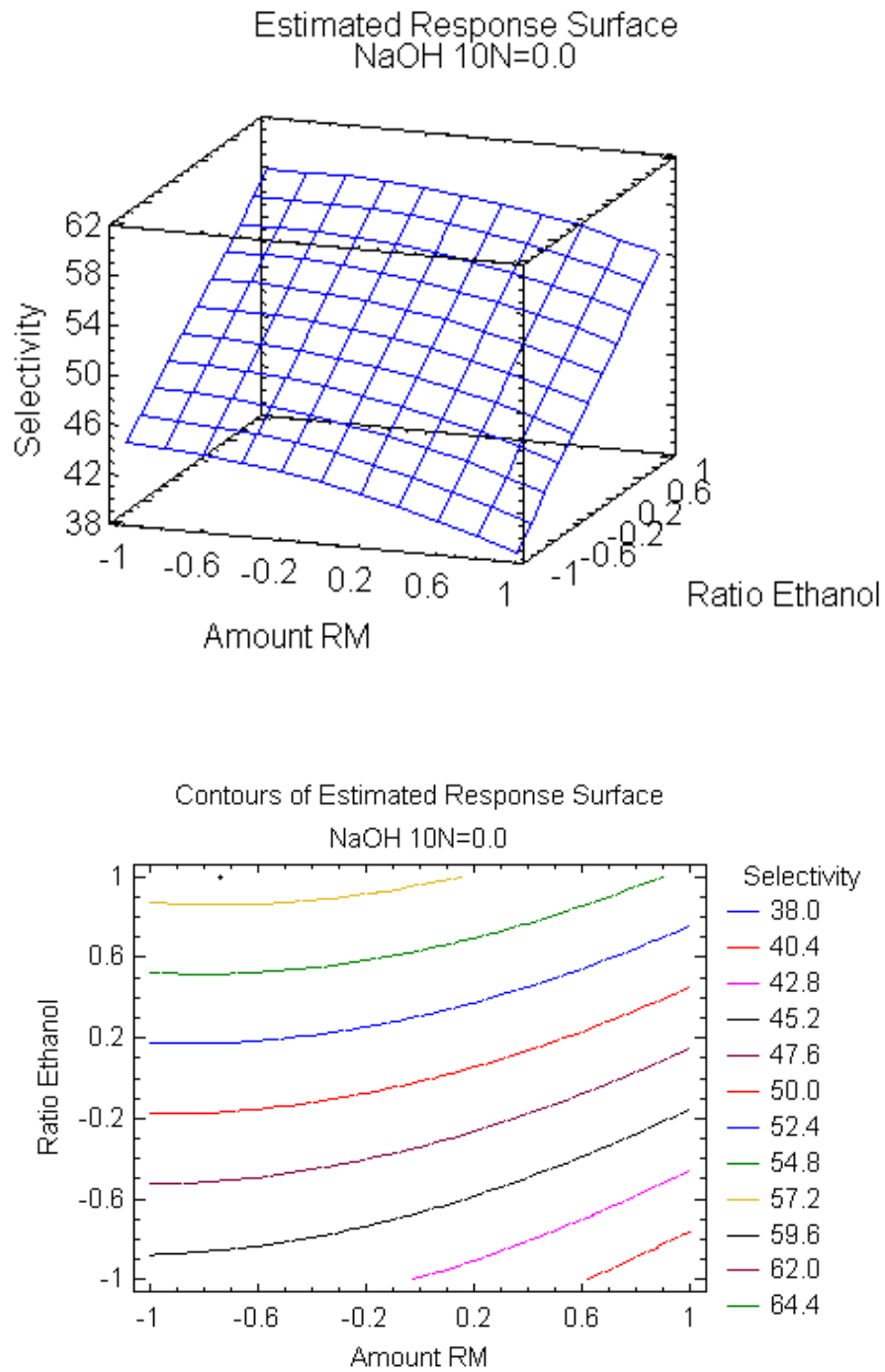


Figura 3.15. Superficie de respuesta estimada con parámetros influyentes como la selectividad cinemática frente a temperatura y aceite/metanol frente al peso.

El ajuste del modelo es bueno, con unos valores de R^2 del 84.955 %, lo cual indica una buena correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo creado, como puede verse en la Figura 3.16.

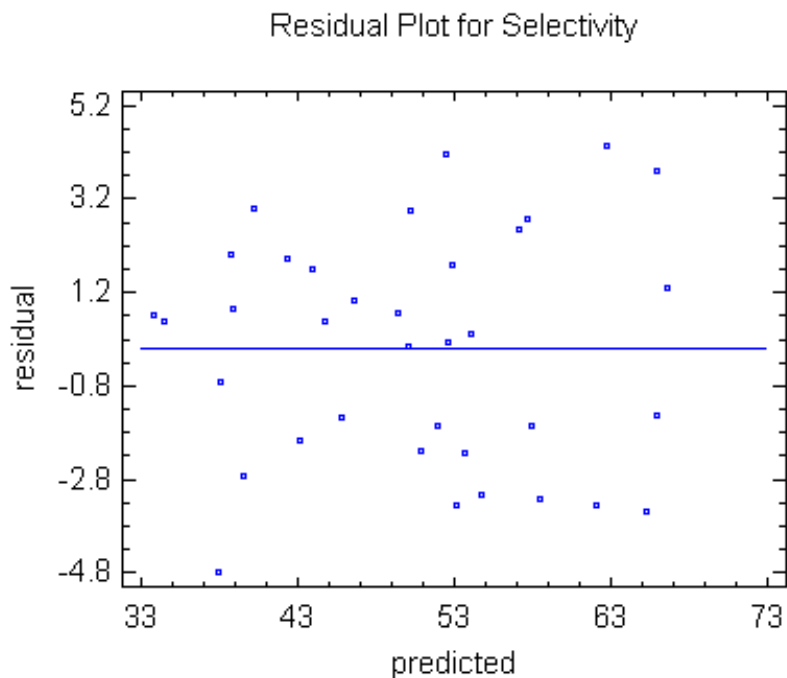


Figura 3.16. Gráfico de probabilidad de la selectividad.

Por tanto, puede concluirse que el modelo creado para correlacionar las variables de reacción (cantidad de lipasa, relación molar aceite/etanol y cantidad de disolución acuosa NaOH 10N) con la selectividad es aceptable, ya que es capaz de explicar la variabilidad producida en la selectividad.

3.3. Sistemas KF soportado

De acuerdo con la bibliografía consultada [341-348], existen diferentes sistemas de KF soportado descritos como catalizadores útiles para la obtención de biodiesel convencional (Norma UNE 14214). Pero, dado el carácter básico más débil de estos sistemas, su uso supone el empleo de condiciones comparativamente más enérgicas que las empleadas cuando se usan catalizadores homogéneos convencionales, NaOH o KOH. No obstante, para conseguir la etanolisis selectiva (Figura 1.9) o la metanolisis parcial (Figura 3.17), necesarias para mantener la glicerina en forma de monoglicérido [349], puede ser más adecuado el empleo de un sistema heterogéneo de carácter básico más débil. Para ello hay que seleccionar las condiciones de operación (temperatura, tiempo de reacción, proporción aceite/metanol, peso de catalizador, etc.), que permitan, mediante el control cinético del proceso, obtener resultados similares a los alcanzados en el proceso enzimático para la obtención de un biocombustible, constituido por una mezcla de FAMES y MGs, evitando así la generación de glicerina libre.

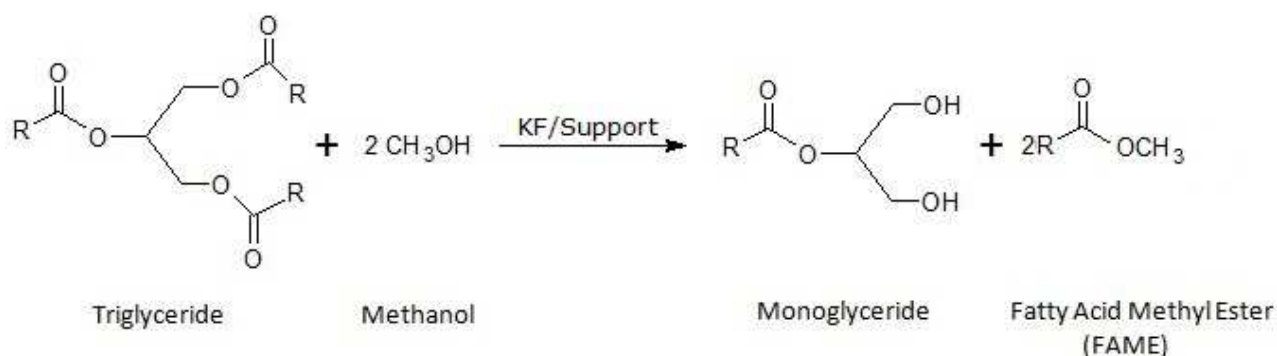


Figura 3.17. Reacción de metanolisis parcial obtenida mediante control cinético del proceso, realizado con el KF soportado en sólidos inorgánicos.

3.3.1. Influencia del sólido empleado como soporte de los sistemas KF soportado

Entre los diferentes sólidos inorgánicos descritos en la literatura como soportes de KF para obtener catalizadores heterogéneos de carácter básico, útiles en la producción de biodiesel convencional [341-345]. En el presente estudio se han utilizado los sólidos inorgánicos Al_2O_3 , ZnO y MgO , que han sido evaluados como soportes de KF en 10% en peso. Estos sistemas de KF soportados se obtuvieron siguiendo una metodología experimental previamente descrita [331]. Para determinar el comportamiento de los diferentes catalizadores soportados, se compararon los resultados obtenidos con los diferentes sistemas de KF soportados, en el

proceso de metanolisis selectiva. Cuando se opera en las condiciones previamente optimizadas, empleando CaO como catalizador heterogéneo en la transesterificación parcial de aceite de girasol [350]. La Tabla 3.29 recoge los resultados obtenidos en este estudio comparativo. Las reacciones se llevaron a cabo con 0.8 g de catalizador sólido, constituido por KF soportado al 10% en peso, en los diferentes sólidos inorgánicos, Al₂O₃, ZnO y MgO soportados en KF, operando a 65 °C de temperatura, con 12 mL de aceite de girasol (32 cSt, viscosidad cinemática) y 2.43 mL de metanol.

Tabla 3.29. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con agitación constante de 700 rpm, empleando 12 mL de aceite de girasol (de viscosidad 32.0 cSt,) 2.43 mL de metanol, operando a 65 °C con tiempos de reacción de 1h, empleando 0.8g de KF soportado al 10% en peso en diferentes sólidos inorgánicos ZnO, MgO, Al₂O₃.

Soporte	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
ZnO	8,40	100	83,54
MgO	5,88	100	92,40
Al ₂ O ₃	4,62	100	94,95

En lo que respecta al efecto del soporte, los resultados recogidos en la Tabla 3.29, ponen de manifiesto que a pesar de obtenerse un 100% de conversión con los tres soportes, los valores de selectividad, también muy elevados, siguen el orden Al₂O₃ > MgO > ZnO, que justifican los correspondientes valores de viscosidad en el orden inverso. Es de destacar que los valores en torno a 4.5 cSt obtenidos con el sistema KF/Al₂O₃ entran dentro de lo permitido para su utilización en forma pura (como B100), es decir, sin necesidad de mezcla con diesel fósil, a pesar de contener prácticamente un 30% de monoglicéridos. Tenemos por tanto que el Ecodiesel, constituido por FAMEs con aproximadamente un 33% de MGs, presenta una viscosidad ligeramente superior a la del biodiesel convencional de 3.5 a 4.5 cSt.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos, con los tres sistemas de KF soportado estudiados como catalizadores en la reacción de transesterificación, en las condiciones experimentales indicadas, se obtuvieron resultados similares a los previamente obtenidos en los procesos enzimáticos, donde en lugar de glicerol se obtienen monoglicéridos

que son solubles en la mezcla de FAME. También es de destacar que las condiciones experimentales aplicadas son claramente más suaves que las requeridas para la producción de biodiesel convencional con similares catalizadores de sistemas KF soportado. Estos resultados también son muy similares a los obtenidos con CaO [350] en lo que respecta a los valores de los parámetros de conversión y de selectividad y ligeramente mejores en lo que se refiere a las selectividades.

3.3.2. Influencia del peso de catalizador KF/Al₂O₃

Teniendo en cuenta los mejores resultados obtenidos con Al₂O₃ como soporte de KF, este catalizador heterogéneo se ha elegido para optimizar los parámetros de reacción, como pueden ser la cantidad de catalizador, la relación molar de aceite/metanol y la temperatura, y de esta manera mejorar los resultados del proceso de metanolisis selectiva de aceite de girasol. Aunque los valores de viscosidad cinemática que se obtienen son muy similares a los del biodiesel convencional derivado del aceite de girasol, ya que presentan valores en el rango de 4.6-8.4 cSt, parece necesario optimizar las condiciones experimentales de operación, a fin de obtener los valores óptimos de viscosidad operando en las condiciones experimentales más ventajosas, sin producir glicerol alguno.

Bajo las condiciones de funcionamiento seleccionadas (temperatura, la relación de aceite/metanol y tiempo de reacción) en un proceso de catálisis heterogénea, la cantidad de catalizador usado determina si las condiciones de funcionamiento están controladas cinéticamente o no. En tal caso, la actividad catalítica es directamente proporcional al peso del catalizador utilizado. Fuera de esta región, en la que el peso del catalizador no afecta al rendimiento del proceso, los resultados no están relacionados estrictamente con el peso de catalizador, lo que indica que el control de la reacción de metanolisis parcial, pasa desde el catalizador a los reactivos. Con esto, tenemos que asumir que el uso de cantidades excesivamente elevadas de catalizador no mejorarán la actividad de la reacción, ya que parte de este catalizador se mantendrá prácticamente inactivo (los centros activos de la superficie del catalizador no están en contacto con los reactivos). Por lo tanto, se puede confirmar que las condiciones estándar aplicadas en la Tabla 3.29, operan realizando un control cinético del proceso de metanolisis parcial estudiado.

Para evaluar la influencia del peso del catalizador en la reacción de metanolisis, se han estudiado diferentes cantidades de catalizador $\text{KF/Al}_2\text{O}_3$ (desde 0.2 a 1 g), operando en las mismas condiciones experimentales estándar, previamente empleados en la Tabla 3.29 para evaluar los diferentes sólidos investigados: 65 °C, 12 mL aceite, 2.43 mL de metanol y 60 minutos de tiempos de reacción. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.30 y se muestran gráficamente en la Figura 3.18. Estos resultados muestran que, bajo las condiciones estándar, la conversión y la selectividad crecen en relación directamente proporcional al peso de catalizador hasta alcanzar prácticamente un máximo con cantidades superiores a 0.8 g de $\text{KF/Al}_2\text{O}_3$ (7% en peso respecto al aceite) en donde los valores de la viscosidad cinemática descienden hasta alcanzar valores alrededor de 4.5 cSt. La evolución de la selectividad y los valores de viscosidad cinemática definen claramente el comportamiento típico de un proceso heterogéneo desarrollado bajo control cinético, debido a la disminución de los valores de viscosidad, que se producen al aumentar el peso del catalizador.

Además, el hecho de que en ningún caso se detectó cantidad alguna de glicerol, en el análisis de GC de los productos de reacción, pone de manifiesto el carácter selectivo del proceso de metanolisis. Esto se puede explicar como una consecuencia del hecho de que el carácter selectivo del proceso se basa más en la fortaleza de los centros básicos activos que en el mayor o menor número de estos centros activos. En consecuencia, puede concluirse que los centros básicos de los catalizadores KF tienen la fuerza suficiente para llevar a cabo la metanolisis en las posiciones 1 y 3 de glicerol (alcoholes primarios), pero no son lo suficientemente fuertes para activar el ataque al alcohol secundario, en la posición 2 de glicerol.

Tabla 3.30. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con tiempos de reacción de 1 hora y agitación constante de 700 rpm, empleando 12 mL de aceite de girasol (de viscosidad 32.0 cSt), 2.43 mL de metanol, operando a 65 °C con diferentes pesos de catalizador KF/ Al₂O₃ soportado al 10% en peso.

Peso (g)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
0,2	7,1	69,7	61,05
0,4	5,76	100	92,3
0,6	6,13	100	97,6
0,8	4,62	100	97,6
1,00	5,48	100	100

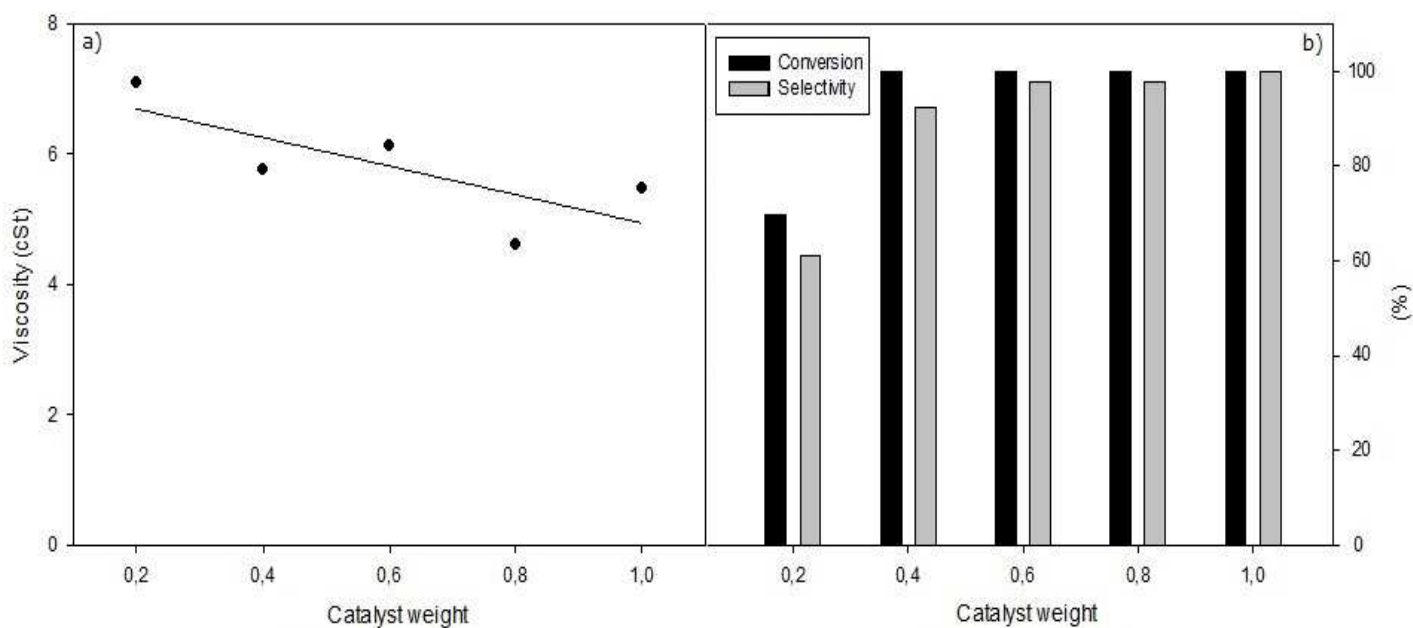


Figura 3.18. (a) Valores de Viscosidad y (b) Conversión y Selectividad, obtenidos en la metanolisis selectiva de aceite de girasol operando bajo las condiciones estándar: tiempo de reacción de 60 min, temperatura de 65 °C, 12 mL de aceite de girasol y 2.43 mL de metanol, con diferentes cantidades de KF/Al₂O₃.

El uso de cantidades más altas de catalizador no aumentará la actividad catalítica debido al control cinético de la reacción bajo las condiciones experimentales. Esto indica que las mejores condiciones experimentales se obtienen mediante el uso de un 8% en peso de catalizador heterogéneo KF/Al₂O₃, respecto a la cantidad de aceite utilizado.

3.3.3. Influencia de la relación molar aceite/metanol en el catalizador KF/Al₂O₃

La influencia de la relación molar aceite/metanol en el rendimiento catalítico del proceso de metanolisis se determinó operando bajo las condiciones experimentales estándar (tiempo de reacción 60 min, temperatura 65 °C, 0.8 g del sistema KF/Al₂O₃ y 12 mL aceite), usando diferentes cantidades de metanol en el intervalo 1.2-2.8 mL (en relación molar desde 1/3 a 1/7). Los resultados que se muestran en la Figura 3.19 indican que a pesar de la disminución continua de los valores de viscosidad cinemática, la conversión y la selectividad llegan a un máximo en la relación molar aceite/metanol 1/5.

De acuerdo con la ley de acción de masas que rige el equilibrio químico en procesos reversibles, la conversión y la selectividad se podría mejorar mediante la introducción de cantidades en exceso de metanol para desplazar el equilibrio y obtener una mayor cantidad de FAME. Los resultados experimentales, recogidos en la Tabla 3.31 y Figura 3.19, indican que el rendimiento de biodiesel (conversión y selectividad) creció con el aumento de relación molar aceite/alcohol hasta que se alcanza el valor máximo en la proporción 1/5, pero cuando este aumento continúa, el rendimiento de la reacción de metanolisis no aumenta e incluso desciende. Por lo tanto, la relación molar de aceite/metanol tiene un impacto significativo en la viscosidad del biodiesel obtenido, en el que el valor de viscosidad más bajo se asocia a una conversión y selectividad más alta, con valores de 100% y 98.8%, respectivamente.

Tabla 3.31. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con tiempos de reacción de 1 hora y agitación constante de 700 rpm, operando a 65 °C con 0.8 g de catalizador $\text{KF/Al}_2\text{O}_3$ y empleando 12 mL de aceite de girasol (de viscosidad 32.0 cSt), con diferentes volúmenes de metanol.

Relación Aceite/MeOH		Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
(mL/mL)	(mol/mol)			
12/1,2	1/3	10,9	91,9	81,9
12/1,6	1/4	7,02	100	97,6
12/2,0	1/5	4,62	100	97,6
12/2,4	1/6	5,39	99,5	89,8
12/2,8	1/7	5,64	100	77,1

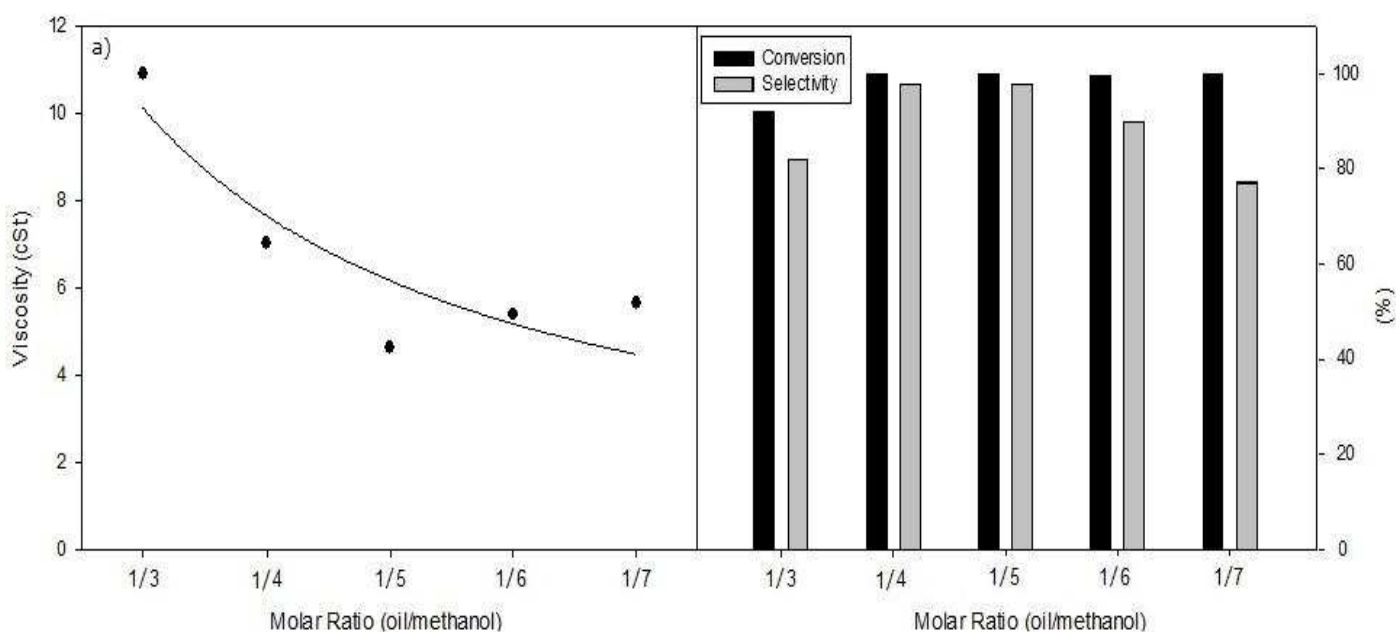


Figura 3.19. (a) Valores de Viscosidad y (b) Conversión y Selectividad, obtenidos en la metanolisis parcial de aceite de girasol en las condiciones estándar, con diferentes relaciones molares.

3.3.4. Influencia de la temperatura sobre el sistema $\text{KF/Al}_2\text{O}_3$

Las condiciones optimizadas de peso de catalizador, tiempo de reacción y relación molar aceite/alcohol, se han establecido operando a una temperatura constante de 65 °C. Sin

embargo, la evaluación de la influencia de la temperatura de reacción en el rendimiento de reacción puede proporcionar información de interés en relación al mecanismo de la reacción heterogénea catalizada, en el proceso de metanolisis de aceite de girasol. Por lo tanto, operando bajo las condiciones experimentales optimizadas: tiempo de reacción 60 min, 0.8 g KF/Al₂O₃, 12 mL de aceite y 2.43 mL de metanol, se han llevado a cabo reacciones a diferentes temperaturas en el intervalo de 45-65°C. Los resultados mostrados en la Tabla 3.32 y la Figura 3.20 indican que la conversión y la selectividad alcanzan el valor más alto, 100% y 99.9%, respectivamente, a temperatura de 50 °C.

Sin embargo, los valores de viscosidad muestran una disminución continua al aumentar la temperatura. Esto se puede explicar considerando que la Selectividad es la suma de los valores de FAMEs y MGs, lo que implica que idénticos valores de Selectividad pueden contener diferentes cantidades de dicha mezcla (FAMEs y MGs). Así, al operar a temperaturas crecientes, en las condiciones indicadas, se obtiene un aumento creciente en la proporción de FAMEs respecto a los MGs. Una mayor proporción de FAMEs supone una menor viscosidad, dado que la viscosidad de estos ésteres metílicos es ligeramente menor que la de los correspondientes MGs.

Tabla 3.32. Reacciones efectuadas a diferentes temperaturas, en condiciones estándar, matraz de 25 mL con tiempos de reacción de 1 hora y agitación constante de 700 rpm, operando a 65 °C con 0.8 g de catalizador KF/Al₂O₃ y empleando 12 mL de aceite de girasol (de viscosidad 32.0 cSt), y 2.7 mL de metanol.

Temperatura (°C)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
45	7,3	94,9	87,3
50	5,72	100	99,9
55	5,4	100	99,9
60	4,89	100	99,9
65	4,62	100	100

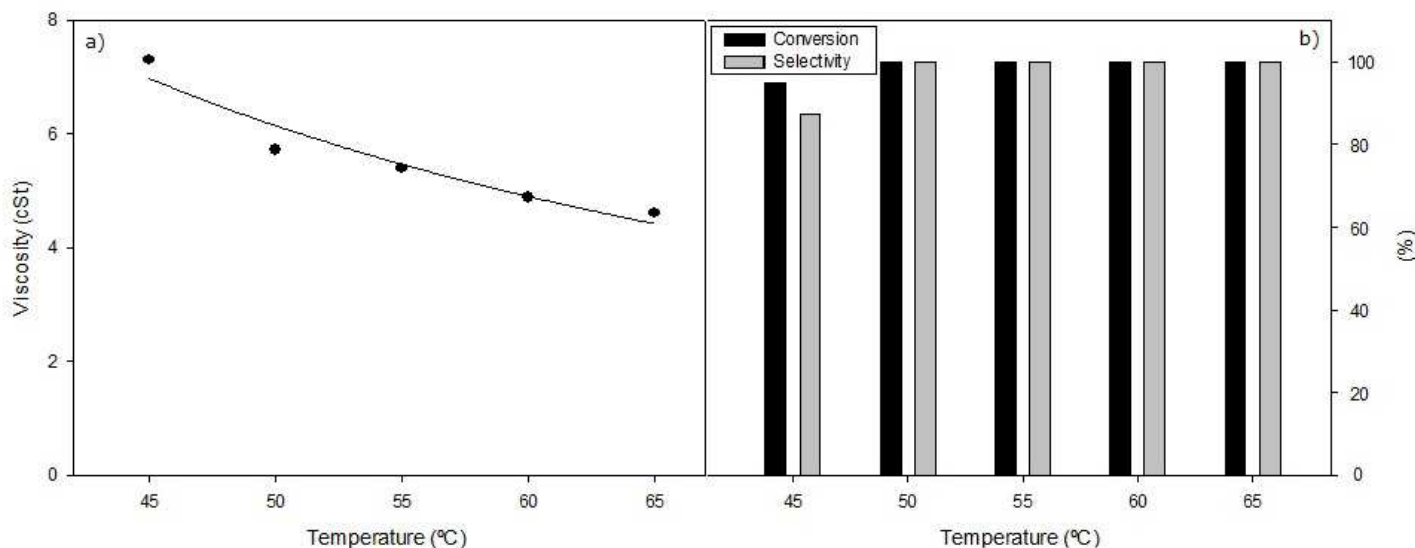


Figura 3.20. Valores de (a) Viscosidad y (b) Conversión y Selectividad, obtenidos en la metanolisis de aceite de girasol en las condiciones estandar, utilizando diferentes temperaturas comprendidas en el intervalo 45–65 °C.

En efecto, la selectividad está determinada por la proporción de los productos obtenidos en la metanolisis, que presentan valores similares de RT (tiempo de retención) a aquellos hidrocarburos que componen el diesel fósil, y en este intervalo no sólo los diferentes FAME están presentes, sino también las MG correspondientes. Además, una selectividad del 99% a la conversión de 100% indicaría la presencia de al menos 1% de DG (diglicéridos), de modo que la viscosidad obtenida es algo mayor que la correspondiente al FAME puro que constituye el biodiesel convencional. Es decir, es perfectamente posible que dos muestras de reacción con los valores de conversión y selectividad similares difieran en valores de viscosidad. Por lo tanto, se concluye que hay que considerar una mayor relevancia a la viscosidad, con respecto a los datos de conversión y selectividad, respecto a la información obtenida en el progreso de la reacción consecutiva en la metanolisis parcial de aceite de girasol.

Por tanto, la viscosidad aparece como el parámetro más sensible para evaluar el progreso de la reacción, que se adapta a la ecuación de Arrhenius (Ecuaciones 1 y 2) como se puede comprobar en la Figura 3.21, donde se puede constatar que la viscosidad cinemática es un parámetro estrechamente relacionado con las constantes de velocidad de la reacción:

$$K = A \cdot \exp(-E_a/RT)$$

Ecuación 1. Ecuación de Arrhenius en forma exponencial.

$$\ln k = \ln A - (E_a/RT)$$

Ecuación 2. Ecuación de Arrhenius en forma logarítmica.

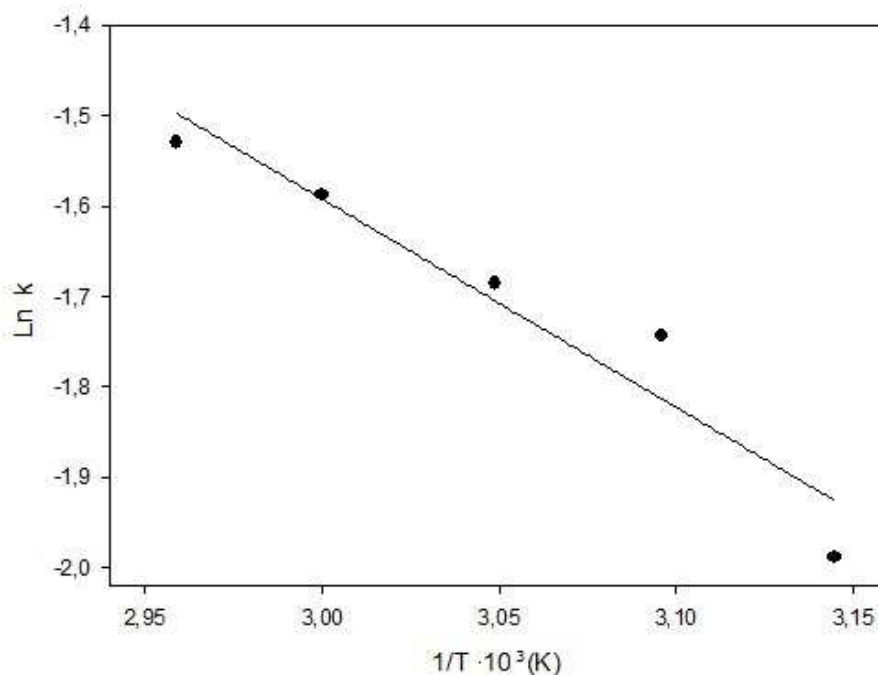


Figura 3.21. Representación de Arrhenius ($\ln k$ vs. $1/T$) obtenida a partir de la evolución con la temperatura de los valores de $\ln k$ en la Ecuación 2, donde: $k = \text{Viscosidad}^{-1}$.

En la Figura 3.21 se muestra que $\ln A$, el factor exponencial de Arrhenius y E_a , la energía de activación de la reacción, se obtiene a partir de la ordenada de origen y la pendiente de la ecuación es lineal con respecto a $1/T$, el valor inverso de la temperatura absoluta (en Kelvin). Como parámetro que mejor determina el progreso de la reacción, k , se emplea el valor inverso de la viscosidad cinemática. Este valor inverso se utiliza debido a que este parámetro disminuye de manera inversamente proporcional con el progreso de la reacción. De esta manera la significancia de la recta es de un 92,05% ($r^2 = 0,9205$). Así, se obtiene que $\ln A = 5,37$, donde A se expresa en cSt^{-1} . El valor de la energía de activación $E_a = 1,16 \text{ kcal/mol}$, un valor relativamente bajo que pone de manifiesto una relativamente baja influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción.

También es importante tener en cuenta cómo la selectividad, la conversión y la inversa de la viscosidad cinemática siguen una evolución paralela entre ellos, por lo que está perfectamente demostrado que existe una transformación de TG en DG y este a su vez en MG. Existe una reducción gradual de los valores de la viscosidad cinemática, esto es debido a que la viscosidad disminuye al reducirse la concentración de TG y DG. La concentración de MG no parece afectar de forma decisiva a la viscosidad de la mezcla, en comparación con los TG o DG. Presumiblemente, la influencia de cada una de estas especies en la viscosidad de la mezcla del producto obtenido en la reacción de metanolisis parcial estará directamente relacionada a los valores relativos de sus respectivos pesos moleculares, de modo que el $TG \approx 3/2 DG \approx 3 MG \approx 3 FAME$.

3.3.5. Influencia del contenido de agua en el medio de reacción.

La posible utilización de aceites usados como materia prima en la reacción de metanolisis parcial, implica llevar a cabo reacciones con cantidades variables de agua, para poder determinar la cantidad límite de agua presente en el aceite usado empleado, que permite su transformación en la mezcla de FAMEs y MGs, útiles como biocombustible. Es por ello que es importante evaluar la capacidad del método para operar en presencia de agua. Para ello se ha llevado a cabo una serie de experimentos que se muestra en la Tabla 3.33 y la Figura 3.22, en los que se han añadido cantidades crecientes de agua (0.012 mL en cada reacción), determinándose a continuación los valores de selectividad y viscosidad, expresados en función del porcentaje de agua respecto al aceite y al metanol.

Tabla 3.33. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz 25 mL con agitación constante de 700 rpm empleando 12 mL de aceite de girasol, de viscosidad 32.0 cSt, y 2.4 mL de metanol, a 65 °C con 0.8 g de catalizador $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$ durante 60 minutos incorporando cantidades crecientes de agua, (0.012 mL) que se expresa en porcentaje con respecto al aceite usado.

H ₂ O (mL)	H ₂ O/MeOH (%)	H ₂ O/Aceite (%)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
0.00	0	0	4,6	100	100
0.012	0,5	0,1	6,8	100	99,8
0.024	1	0,2	7,4	99,1	98,7
0.036	1,5	0,3	10,8	98,3	96,5
0.049	2	0,4	13,4	96,7	94,8
0.061	2,5	0,5	15,3	94,0	91,0

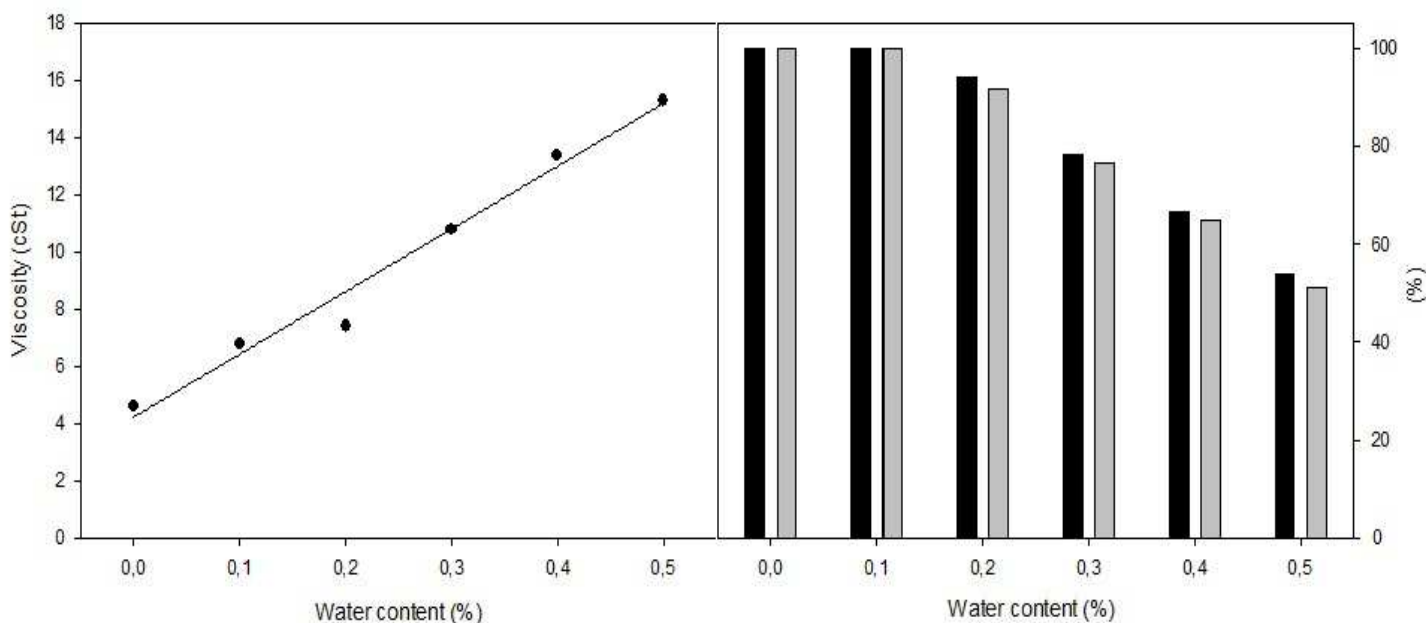


Figura 3.22. Representación de las reacciones efectuadas en condiciones estándar, de acuerdo a los valores recogidos en la Tabla 3.33, incorporando cantidades crecientes de agua, (0.012 mL) que se expresa en porcentaje con respecto al aceite usado.

La representación gráfica de estos resultados pone de manifiesto la obtención de un paulatino descenso de la viscosidad, debido a la caída paralela de la conversión y selectividad

del proceso, que se asocia a la desactivación del KF soportado. Esta desactivación puede atribuirse bien a la disminución del número de centros activos capaces de realizar el proceso de alcoholisis o a la interferencia del agua en el mecanismo de la reacción. En cualquier caso, la aplicación de aceites usados con estos sistemas heterogéneos KF/Al₂O₃ supone la necesidad de realizar un tratamiento previo a los mismos, a fin de eliminar el agua que habitualmente contienen, dada su baja tolerancia a la presencia de agua en el medio, 0.2 % en peso, una cantidad relativamente baja para los contenidos habituales de estos aceites reciclados. Sin embargo, es previsible que no se produzca ningún problema al ser aplicado con aceites (comestibles o no) provenientes de cualquier otro tipo de semillas, siempre que estén adecuadamente refinados y sobre todo completamente libres de agua.

3.3.6. Posibilidad de reutilización de los 3 sistemas catalíticos KF soportados.

Teniendo en cuenta que la principal ventaja del uso de catalizadores heterogéneos es la posibilidad de su reutilización, se ha estudiado el comportamiento catalítico de los tres catalizadores KF soportado (Al₂O₃, ZnO y MgO) después de los reusos. Las Figuras 3.23-3.25 muestran la variación de la conversión, la selectividad y la viscosidad en los cinco reusos realizados con los tres sistemas catalíticos estudiados.

Para evaluar el comportamiento tras las sucesivas reutilizaciones de los diferentes catalizadores de KF depositado en los tres soportes investigados, se realizaron reacciones en las condiciones de operación estándar: 12 mL de aceite de girasol y 2.43 mL de metanol (correspondiente a una relación molar 1/6 de aceite/metanol), y 0.8 g de catalizador (7% en peso), operando a 65 °C durante 60 min y con agitación constante de 700 rpm. Así, después de permitir que el producto de reacción se decantase durante una hora, el líquido sobrenadante se retiró con una pipeta y el catalizador KF soportado queda depositado en la parte inferior del matraz, listo para ser utilizado de nuevo en la siguiente reacción, que se inicia con la adición de los reactivos indicados.

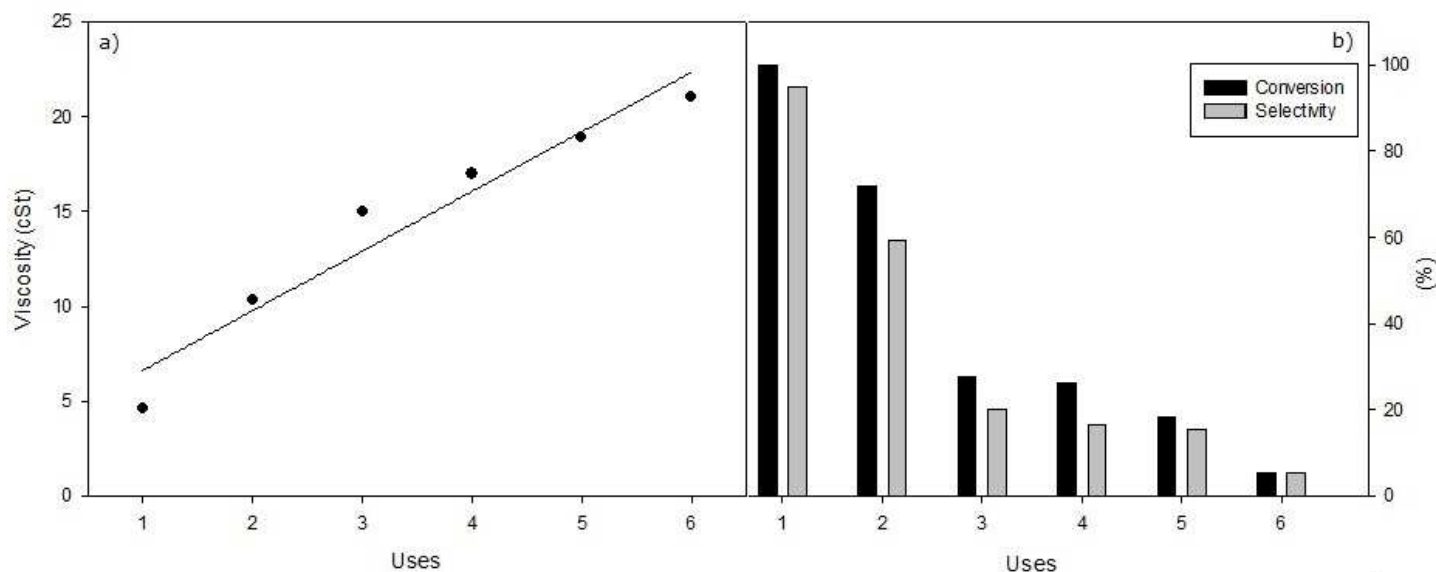


Figura 3.23. (a) Valor de la Viscosidad obtenido en los sucesivos reúsos de la metanolisis parcial de aceite de girasol bajo las condiciones estandar, con 0.8 g de $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$, 65 °C, 12 mL de aceite de girasol y 2.43 mL metanol. (b) Valores de Conversión y Selectividad obtenidos en las mismas condiciones.

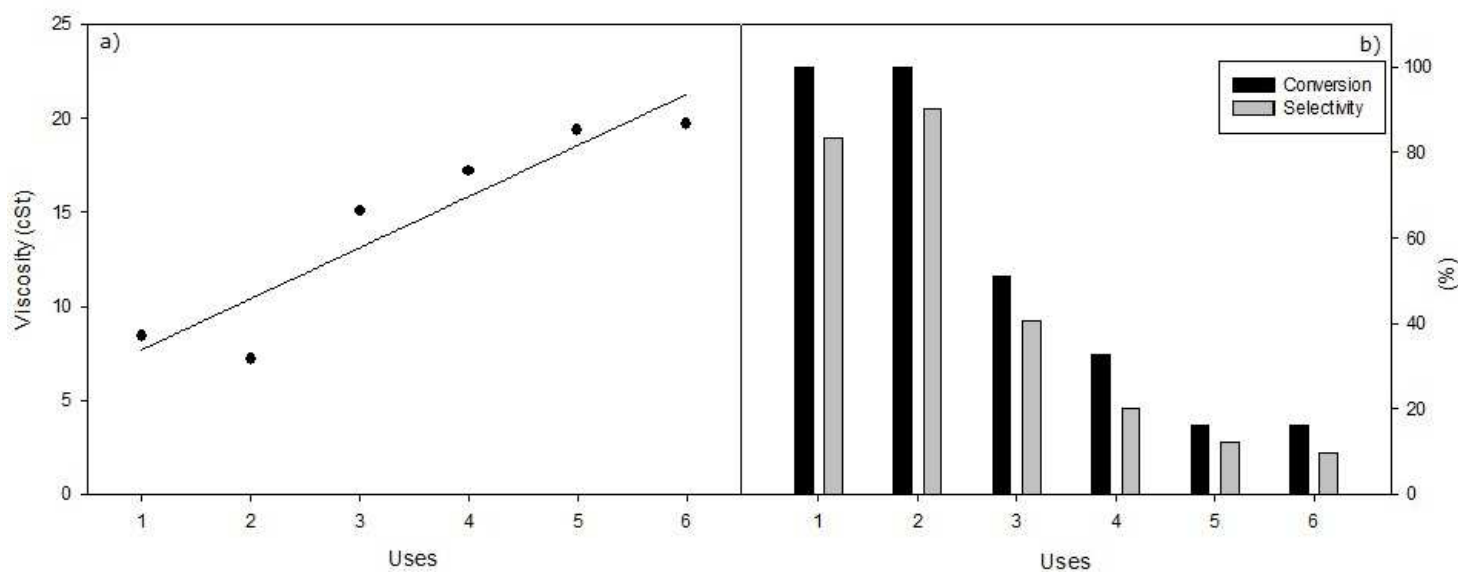


Figura 3.24. (a) Valor de la Viscosidad obtenido en los sucesivos reúsos de la metanolisis parcial de aceite de girasol bajo las condiciones estandar, con 0.8 g de KF/ZnO , 65 °C, 12 mL de aceite de girasol y 2.43 mL metanol. (b) Valores de Conversión y Selectividad obtenidos en las mismas condiciones.

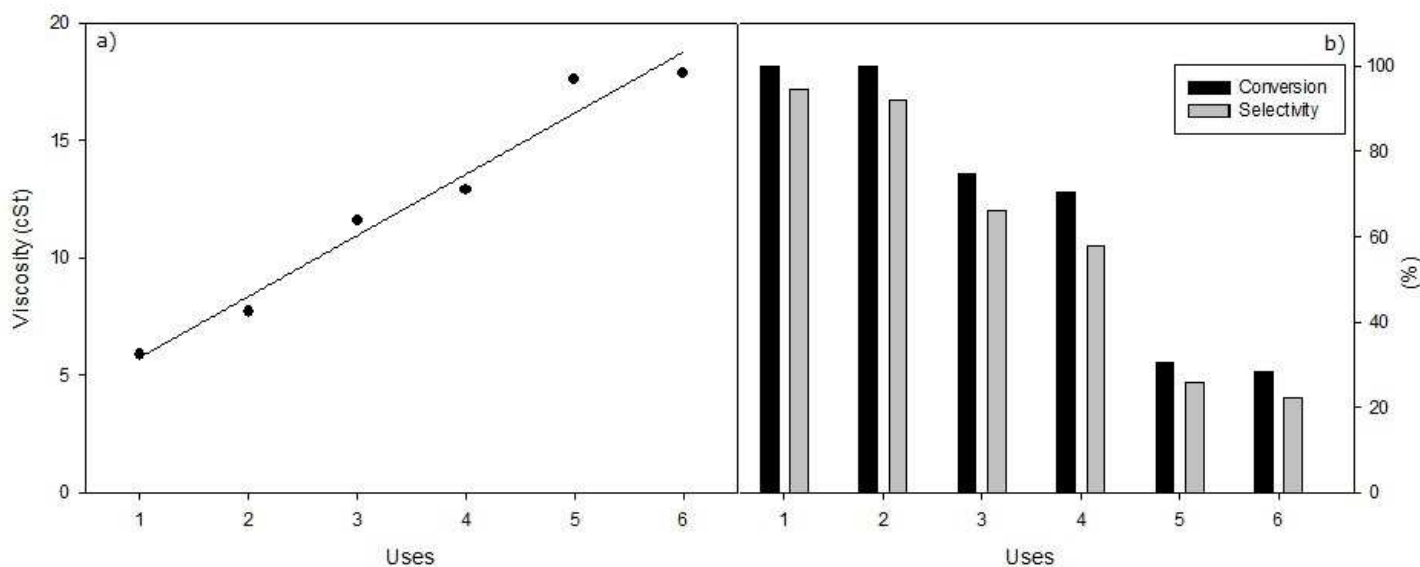


Figura 3.25. (a) Valor de la Viscosidad obtenido en los sucesivos reúsos de la metanolisis parcial de aceite de girasol bajo las condiciones estandar, con 0.8 g de KF/MgO, 65 °C, 12 mL de aceite de girasol y 2.43 mL metanol. (b) Valores de Conversión y Selectividad obtenidos en las mismas condiciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las Figuras 3.23-3.25, con los tres catalizadores KF soportados se obtiene que, después de la primera reacción, la conversión y la selectividad disminuyen continuamente mientras que la viscosidad cinemática se aumenta desde 5-7 cSt hasta valores cercanos de 20 cSt, correspondiente a una disminución en las conversiones y selectividad de 100% a valores inferiores a 10%.

A este respecto, el catalizador KF/Al₂O₃ presenta el peor comportamiento catalítico respecto a la capacidad de reutilización, a pesar del hecho de ser el mejor catalizador estudiado en la primera reacción. Los catalizadores de KF/ZnO y KF/MgO permiten una segunda reutilización, con un comportamiento catalítico similar al de la primera reacción, y también presentan una disminución más suave en la conversión y el rendimiento con el catalizador KF/Al₂O₃.

La poca eficiencia en la reutilización de estos sistemas heterogéneos es la principal limitación que presenta este tipo de catalizadores. La desactivación del catalizador en ningún caso podría estar asociada a la lixiviación del KF en los distintos soportes, de acuerdo a los resultados obtenidos después de la separación de los catalizadores sólidos de la reacción cuando se inició la misma. Estos estudios complementarios, incluidos en la sección

experimental, indican que la reacción fue siempre completamente interrumpida después de la separación del catalizador KF soportado. Por lo tanto, no hay KF presente en el medio de reacción. De esta manera, la desactivación debe ser atribuida a algún tipo de interacción con los centros activos, en este caso KF, de los productos de reacción o a las impurezas que contengan los aceites empleados, como los ácidos grasos libres presentes en muy pequeñas cantidades en el aceite de girasol.

3.4. Óxido de Calcio

Para evaluar el óxido de calcio como catalizador heterogéneo de carácter básico hay que proceder a su preparación, siguiendo la metodología indicada en la sección 2.4, en la que básicamente se describe el procedimiento experimental seguido para transformar piezas de óxido de calcio de varios centímetros de diámetro, cubierto en su superficie por carbonato de calcio, en un polvo tamizado a un tamaño menor que 0.3 mm de diámetro, activado mediante su transformación en CaO limpio de carbonato. Esto se consigue mediante calcinación en mufla a temperatura constante a 600 °C durante 6 horas, con un protocolo de ascenso (10 °C/min) y descenso de la temperatura, durante 3 horas, antes de depositar el sólido pulverulento en un recipiente cerrado, evitando el contacto con el aire, a fin de evitar su posterior reacción con el CO₂ de la atmosfera.

A efectos de caracterizar el óxido de calcio como catalizador heterogéneo se emplean de forma general las condiciones experimentales aplicadas con los catalizadores heterogéneos KF/soporte, procediéndose a la optimización de los diferentes parámetros significativos, tiempo de reacción, peso de catalizador, temperatura, relación aceite/metanol, cantidad de agua o la capacidad de reutilización. Además en estudios previos se determinó que la velocidad de agitación se establecerá como una constante a 700 rpm, ya que a partir de 300 rpm este parámetro no influye en la cinética de la reacción de transesterificación [350].

3.4.1. Influencia del tiempo de reacción

Se realizaron 5 reacciones con las mismas condiciones experimentales (relación molar aceite/metanol 1/6, temperatura 65 °C y peso de catalizador 0,8 g), variando el tiempo de la reacción para determinar el momento en el que la reacción alcanza el valor máximo de conversión y selectividad. Se operó con tiempo de reacción desde 15 minutos hasta 3 horas, como se muestra en la Tabla 3.34 y Figura 3.26.

Tabla 3.34. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con agitación constante de 700 rpm, empleando 12 mL de aceite de girasol (de viscosidad 32.0 cSt), 2.43 mL de metanol, operando a 65 °C con 0.8g de óxido de Calcio a diferentes tiempos de reacción.

Tiempo (min)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
15	19,03	8,92	5,95
30	18,60	24,95	19,9
60	13,39	70,98	68,8
120	13,10	75,64	71,6
180	12,73	80,92	72,9

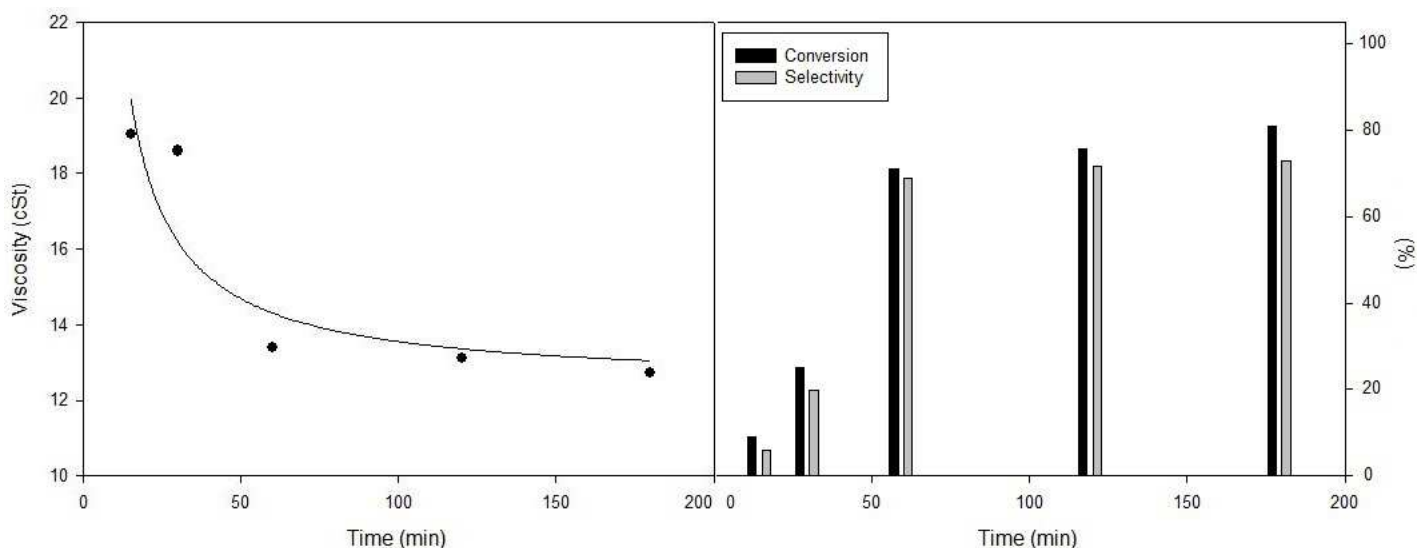


Figura 3.26. Representación gráfica de la variación de la viscosidad, la conversión y la selectividad con respecto al tiempo, en las condiciones establecidas en la Tabla 3.34.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que a partir de una hora, la conversión, selectividad y viscosidad alcanzadas se mantienen constantes, por lo que las diferentes reacciones de optimización se han realizado con un tiempo de reacción de una hora. Por otra parte, hay que destacar que aunque se obtienen valores de conversión del 100%, como en los sistemas de KF soportados, los valores de selectividad son inferiores, lo que explicaría los valores superiores de viscosidad que se obtienen con el CaO, en comparación con los sistemas KF soportados.

3.4.2. Influencia de la cantidad de catalizador

Una vez establecidos como fijos los parámetros de agitación superior a los 300 rpm y el tiempo de reacción en 1 hora, se lleva a cabo un estudio relativo a la influencia del peso de catalizador, el CaO investigado, en la reacción de transesterificación parcial del aceite de girasol.

A este respecto, se han realizado 7 reacciones con diferentes pesos de CaO (Tabla 3.35 y Figura 3.27) operando bajo idénticas condiciones experimentales, en las que sólo se modifica la cantidad de catalizador, para estudiar su influencia en la reacción.

Tabla 3.35. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con agitación constante de 700 rpm, empleando 12 mL de aceite de girasol, de viscosidad 32.0 cSt, 2.43 mL de metanol, a 65 °C y tiempo constante de 60 minutos, con cantidades variables de CaO.

Peso (g)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
0,1	21,18	18,73	4,68
0,2	19,23	16,25	8,75
0,4	19,07	31,88	28,02
0,6	15,18	55,28	49,39
0,8	13,39	70,98	68,83
1,0	14,85	57,49	39,61
1,2	17,04	33,02	32,36

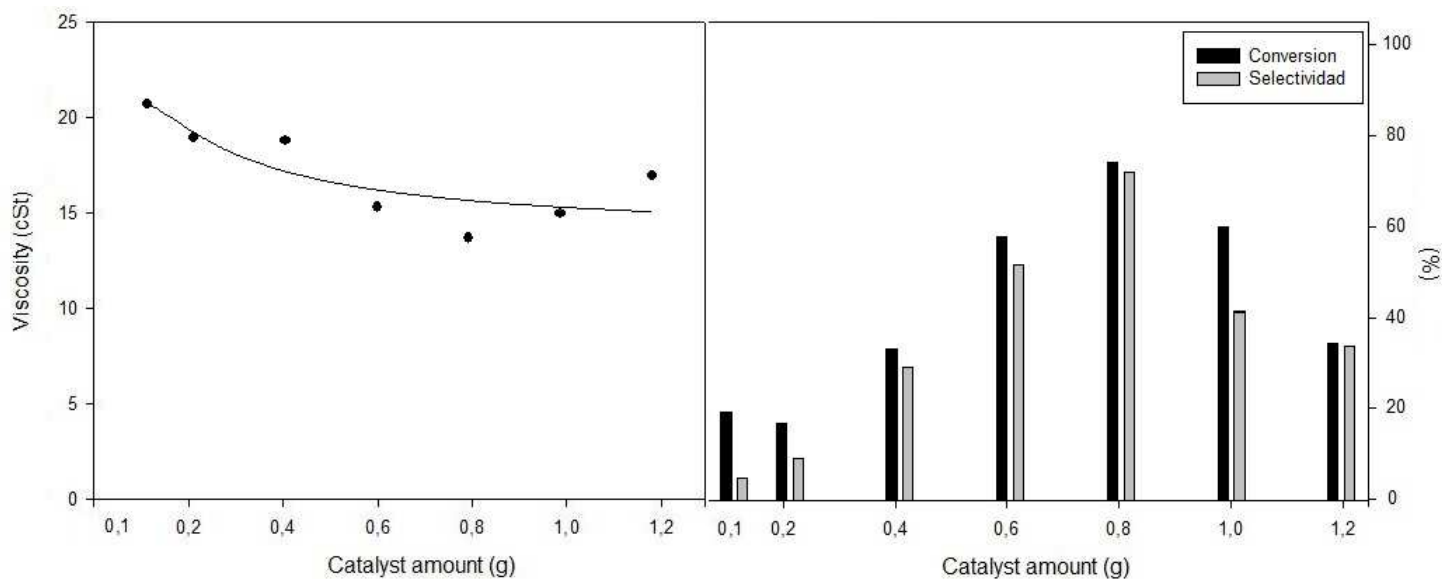


Figura 3.27. Representación gráfica de la variación de la viscosidad, la selectividad y la conversión con respecto a la cantidad de catalizador empleado, en las condiciones establecidas en la Tabla 3.35.

Los resultados representados en la Figura 3.27 muestran una lenta, pero definida tendencia de reducción de la viscosidad y de aumento de la conversión con el peso de catalizador empleado, operando en las condiciones establecidas.

3.4.3. Influencia de la temperatura

Para evaluar la influencia de la temperatura en la reacción de transesterificación parcial, hemos estudiado un rango de temperaturas comprendido entre 25-65 °C. Estas reacciones son recogidas en la Tabla 3.36, y se muestran gráficamente en la Figura 3.28.

Tabla 3.36. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con agitación constante de 700 rpm, empleando 12 mL de aceite de girasol, 2.43 mL de metanol, 0.8 g de peso de catalizador CaO, 60 minutos de reacción y diferentes temperaturas de reacción (25-65°C).

Temperatura (°C)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
25	19,15	24,82	8,43
35	18,09	25,00	9,09
45	14,77	73,7	40,01
55	14,12	100	68,85
65	13,39	100	98,83

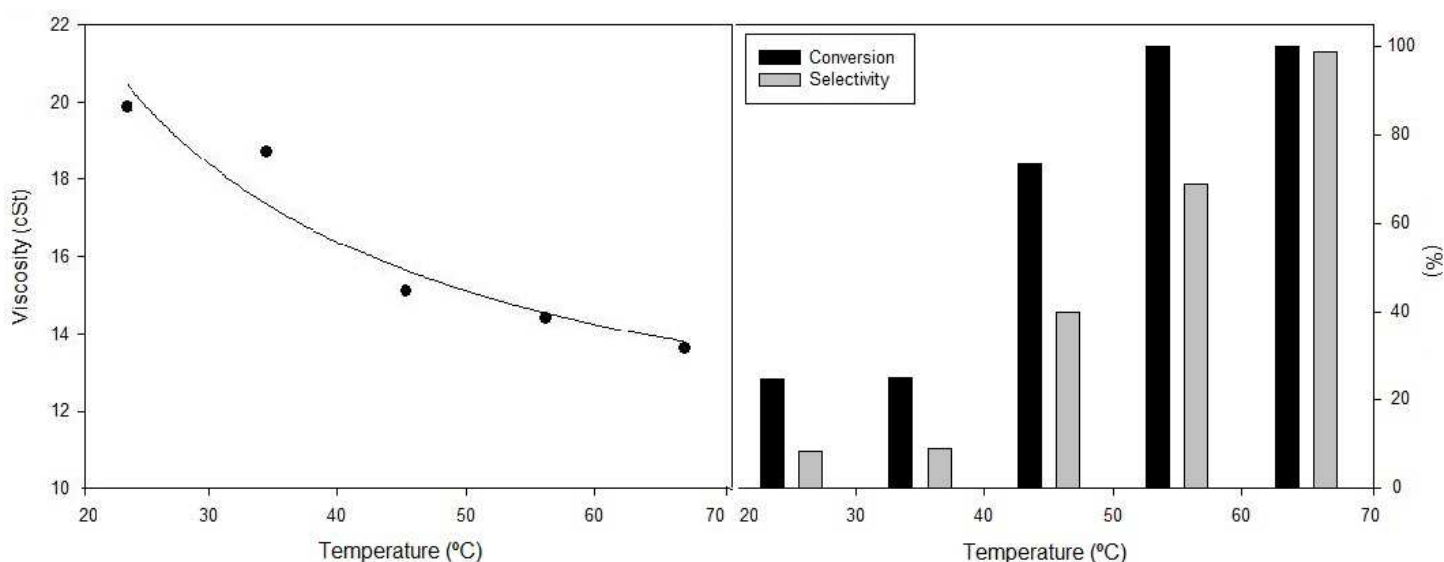


Figura 3.28. Gráfica de representación de la variación de la viscosidad en relación con la temperatura en las condiciones establecidas en la Tabla 3.36.

La evolución de la Conversión, Selectividad y Viscosidad son parámetros directamente relacionados con la velocidad de reacción. Por esto puede estudiarse su correlación con la temperatura de reacción, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.29, en las que se representan los valores de $\ln r$ frente al inverso de la temperatura absoluta (T^{-1}). En dicha gráfica se representan los valores de la conversión y selectividad, así como del inverso de la viscosidad (dado que este parámetro disminuye con el progreso de la reacción), respectivamente. La Tabla 3.37 recoge los valores obtenidos en la

representación de la Figura 3.30. Es importante también constatar como la Selectividad, la Conversión y el inverso de la Viscosidad siguen una evolución paralela, de forma que queda perfectamente demostrado como al pasar los TG a DG y estos a MG se obtiene una paulatina reducción en los valores de la Viscosidad, es decir, la viscosidad disminuye tanto más cuanto más se reduce la concentración de triglicéridos.

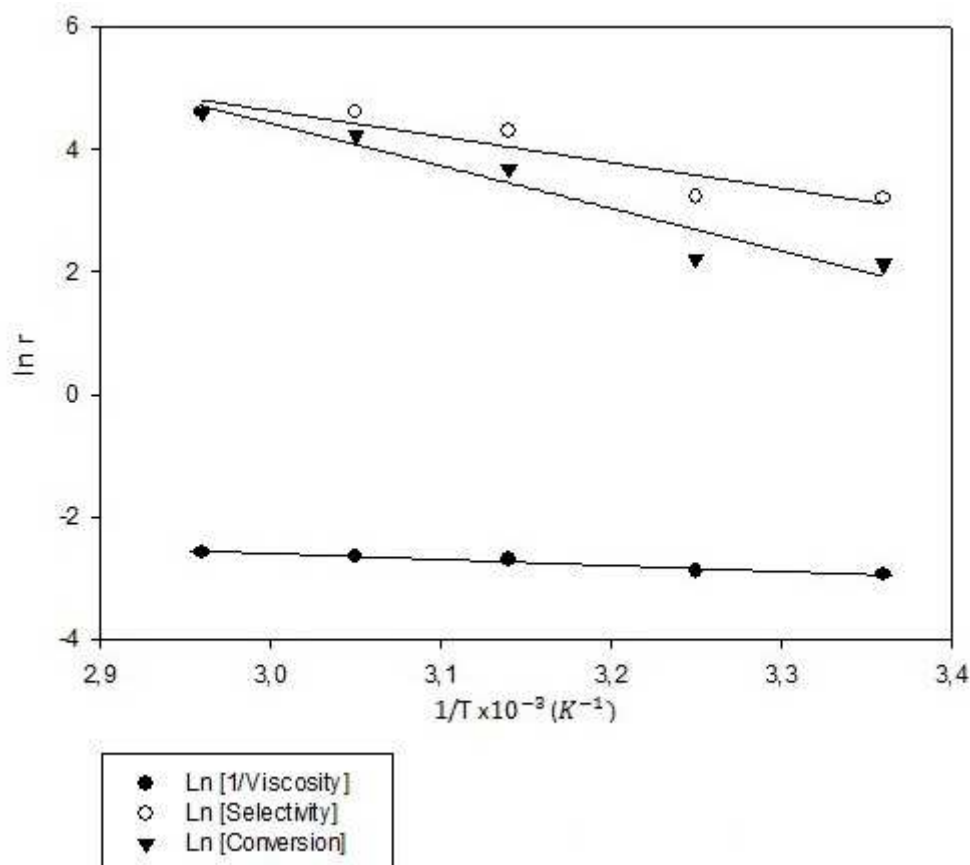


Figura 3.29. Representación de Arrhenius (Ln r vs. 1/T) obtenida a partir de la evolución con la temperatura de los valores de ln r en la Tabla 3.36, donde: (●) r = Viscosidad⁻¹ y (▼) r = Selectividad.

Tabla 3.37. Energía de activación E_a (Kcal/mol) y constante de Arrhenius, Ln A.

Parámetros cinéticos	Parámetros de activación		r ²
	E _a (kcal/mol)	ln A	
Selectividad	13,781 ± 2,18	2,52 ± 3,47	0,930
Conversión	8,396 ± 1,904	17,31 ± 3,02	0,866
Viscosidad⁻¹	1,915 ± 0,26	0,294 ± 0,405	0,949

Como podemos ver en la Tabla 3.37 existe una elevada significancia (>85%) entre los parámetros de activación y los parámetros cinéticos.

Los valores de E_a y $\ln A$ obtenidos respecto a la inversa de la viscosidad, mayores y menores respectivamente que aquellos obtenidos con el catalizador KF/Al_2O_3 , ponen de manifiesto que el catalizador CaO manifiesta mayor sensibilidad a la temperatura que el KF soportado, lo que a su vez indica un carácter más eficiente como catalizador del proceso estudiado, pero el bajo valor de $\ln A$ implica un menor número de centros activos, probablemente responsable de la menor eficiencia del CaO respecto al sistema KF/Al_2O_3 .

3.4.4. Influencia de la relación aceite/metanol

Para estudiar la influencia de la relación aceite/metanol, se han realizado experimentos con cantidades crecientes de metanol, desde 0.82 mL hasta 4.84 mL, con la misma cantidad de aceite, 12 mL. Los resultados obtenidos al efectuar estas reacciones están recogidos en la Tabla 3.38 y se muestran gráficamente en la Figura 3.30.

Tabla 3.38. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz de 25 mL con agitación constante de 700 rpm, a 65 °C, con 0.8g de CaO , 60 minutos de tiempo de reacción, empleando 12 mL de aceite de girasol, de viscosidad 32.0 cSt, y diferentes relaciones molares (2/1-12/1) aceite/metanol.

Ratio mL/mL	Ratio mol/mol	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
12/0,82	1/2	18,18	10,60	5,65
12/1,22	1/3	19,72	12,05	5,76
12/1,62	1/4	12,58	76,41	51,96
12/2,43	1/6	13,39	100	98,83
12/3,23	1/8	14,04	48,19	38,55
12/4,04	1/10	17,04	20,48	12,05
12/4,84	1/12	21,71	42,37	16,92

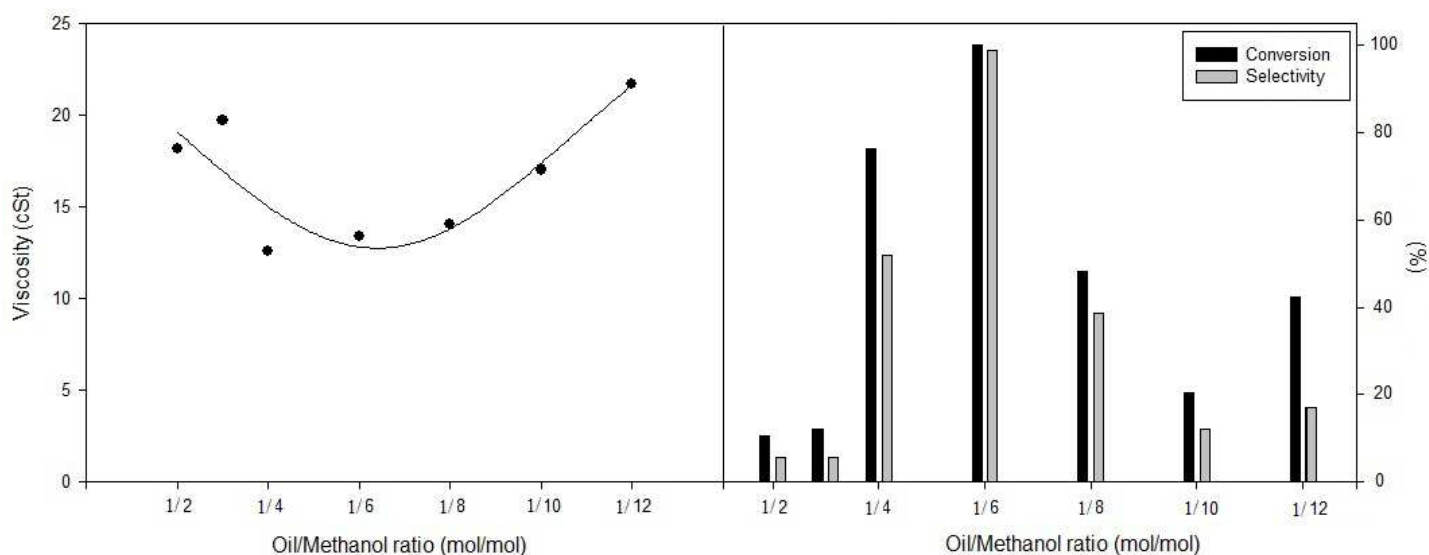


Figura 3.30. Representación gráfica de la variación de la viscosidad, conversión y selectividad con la relación molar aceite/metanol, en las condiciones establecidas en la Tabla 3.38.

En lo que respecta al efecto de la relación molar aceite/metanol (Figura 3.30) obtenemos un máximo de conversión en el intervalo 1/4 a 1/8, en relación molar aceite/metanol. Es decir, la conversión se reduce con bajas proporciones de metanol, como parece lógico en función del equilibrio químico, pero también un exceso de metanol perjudica la conversión.

3.4.5. Influencia de la presencia de agua en el medio de reacción

La aplicación de aceites usados como materia prima, implica llevar a cabo las reacciones con cantidades de agua variables, dependiendo del origen del aceite usado empleado. Es por ello que es importante evaluar la capacidad del método para operar en presencia de pequeñas cantidades de agua. Para ello se ha llevado a cabo una serie de experimentos en los que se ha incorporado cantidades crecientes de agua (0.012 mL), determinando así los valores de selectividad y viscosidad, expresados en función del porcentaje de agua respecto al aceite y al metanol.

Para estudiar la influencia del agua en el medio de reacción se han realizado 6 experimentos con cantidades crecientes de agua, expresados en relación con el metanol y con el aceite (en tanto por ciento). Los resultados de las reacciones se recogen en la Tabla 3.39 y se representan en la Figura 3.31, las cuales se han realizado en las condiciones estándar (0.8g de

CaO, 12 mL de aceite de girasol, 2.43mL de metanol, a 65 °C de temperatura y durante 60 minutos).

Tabla 3.39. Reacciones efectuadas en condiciones estándar, matraz 25 mL con agitación constante de 700 rpm empleando 12 mL de aceite de girasol, de viscosidad 32.0 cSt, a temperatura de 65 °C, 0.8g de CaO, 2.43mL de metanol durante 60 minutos con cantidades crecientes (0.012 mL) de agua en porcentaje con respecto al aceite usado.

H ₂ O/MeOH (%)	H ₂ O/Aceite (%)	H ₂ O (mL)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
0	0	0.00	13,39	70,98	65,83
0,5	0,1	0.012	10,75	83,68	80,96
1	0,2	0.024	5,84	100	98,78
1,5	0,3	0.036	7,39	90,98	88,68
2	0,4	0.049	6,78	95,78	93,80
2,5	0,5	0.061	15,26	60,61	55,03

La representación gráfica de estos resultados en la Figura 3.31 pone de manifiesto la obtención de un máximo de conversión y selectividad del proceso, que se asocia a un mínimo de la viscosidad cuando los porcentajes de agua respecto al aceite se sitúan en el intervalo 1-2 %. La obtención de este máximo puede interpretarse en base a la generación de un mayor número de centros activos y/o a la activación de los centros activos a causa de la participación del agua en la configuración de los centros activos.

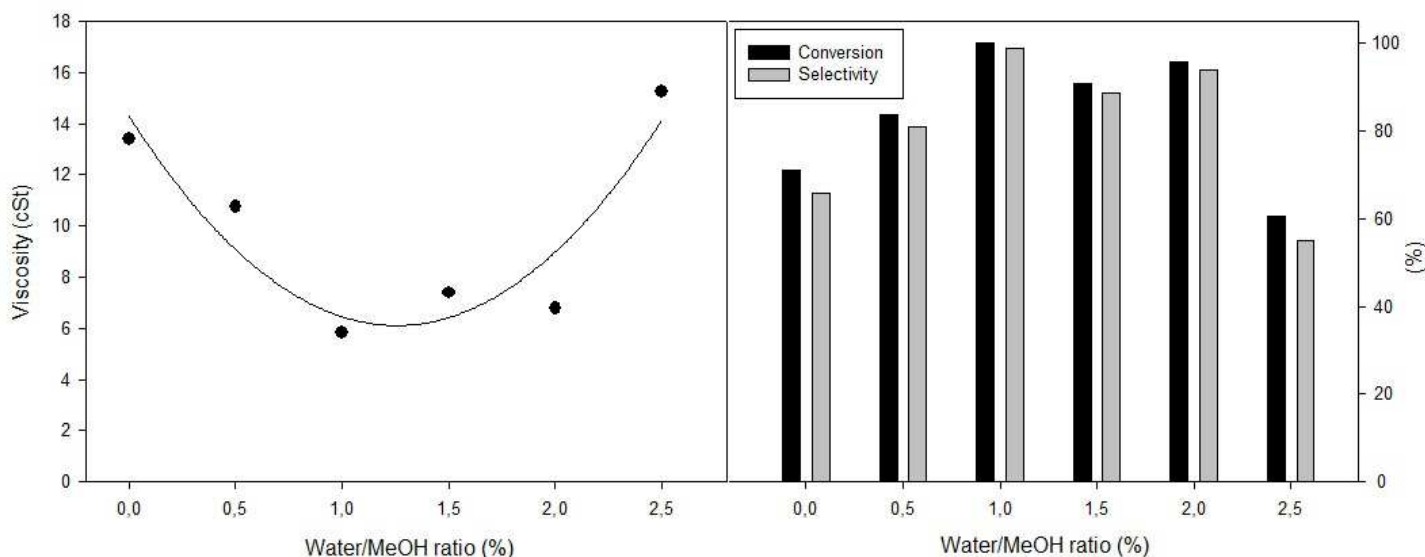


Figura 3.31. Gráfica de representación de la variación de la viscosidad, la conversión y la selectividad en relación con el ratio agua/metanol, en las condiciones establecidas en la Tabla 3.39.

Como se puede ver en la Figura 3.31 existe un óptimo de adición de agua en el intervalo 1-2% en relación al metanol. A partir del 2% con respecto al metanol, el agua influye negativamente a la reacción, la viscosidad asciende desde 6,8 cSt (en 2%) a 15,3 cSt (en 3%) viscosidad incluso superior a la reacción sin ninguna cantidad de agua en el medio de reacción. Este descenso en la viscosidad pone de manifiesto un aumento en la calidad de los centros básicos superficiales tras su reacción con el agua.

El papel que juega el agua en el proceso catalítico puede abordarse a partir de la variación que experimenten los parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius, determinados con la cantidad óptima de agua (0.03 %), a partir de los datos de Viscosidad y Selectividad de las reacciones recogidas en la Tabla 3.40. Puede comprobarse en la Figura 3.32 una caída directa de la viscosidad con la temperatura de reacción, que se adapta perfectamente a la ecuación de Arrhenius, como puede comprobarse en la Figura 3.33. La Tabla 3.41 recoge los valores cinéticos del proceso, obtenidos de la pendiente y la ordenada en el origen de la Figura 3.33.

Tabla 3.40. Reacciones test efectuadas en matraz 25 mL con agitación constante de 700 rpm. Se han empleado 12 mL de aceite de girasol, de viscosidad 32.0 cSt, 0.8g de CaO, 2.43mL de metanol, 1.5% Agua/Metanol durante 60 minutos con diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
25	23,46	3,26	0,85
35	22,81	9,21	6,69
45	17,81	17,42	8,19
55	16,31	56,16	44,53
65	7,39	100	98,68

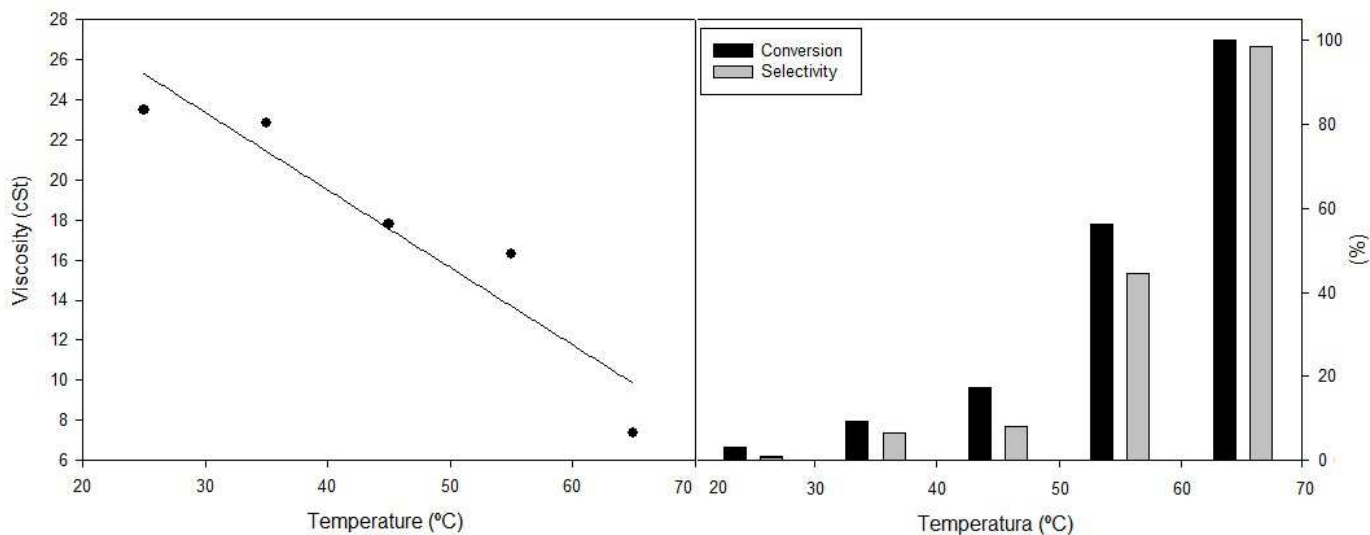


Figura 3.32. Representación gráfica de la variación de la viscosidad, la conversión y la selectividad en relación con la temperatura, en las condiciones establecidas en la Tabla 3.40.

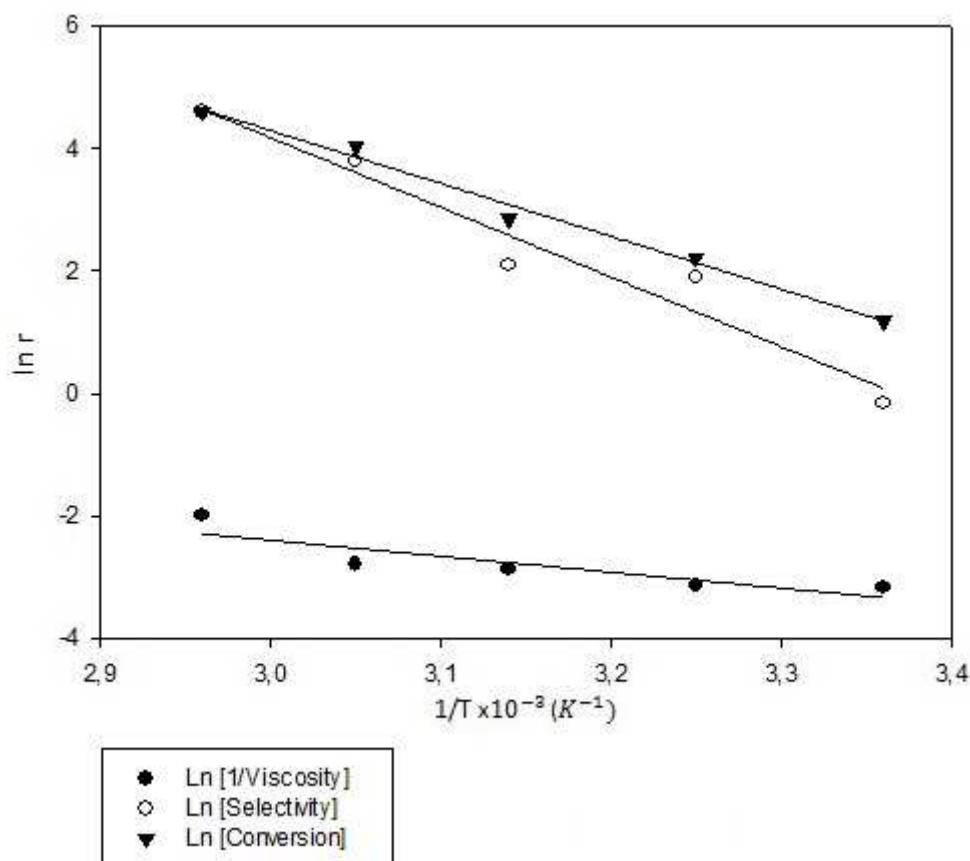


Figura 3.33. Representación de Arrhenius ($\ln r$ vs. $1/T$) obtenida según la Tabla 3.13: (●) \ln viscosidad⁻¹; (▼) \ln conversión; (○) \ln selectividad.

Tabla 3.41. Energía de activación E_a (Kcal/mol) y constante de Arrhenius, $\ln A$, representados según los datos obtenidos con la variación de Temperatura.

Parámetros cinéticos	Parámetros de activación		r^2
	E_a (kcal/mol)	$\ln A$	
Selectividad	$22,614 \pm 2,925$	$3,830 \pm 4,643$	0,952
Conversión	$17,159 \pm 1,071$	$30,20 \pm 1,700$	0,988
Viscosidad⁻¹	$5,171 \pm 1,644$	$5,408 \pm 2,611$	0,767

La comparación de las Tablas 4.40 y 4.41 pone de manifiesto que el aumento de selectividad y viscosidad, debido a la presencia de un 0.03 % de agua respecto al aceite de girasol, se asocia al aumento del número de centros activos (aumento de los valores de $\ln A$), como al aumento de la actividad catalítica de los centros preexistentes, ya que los valores de E_a quedan más que duplicados. Es decir, la presencia de una pequeña cantidad de agua es

beneficiosa, en el sentido de que se incrementa tanto la actividad catalítica de los centros activos como el propio número de centros. Mayor cantidad de agua produce por el contrario una caída de la actividad catalítica, probablemente debido a la desactivación de los centros básicos, por una hidratación excesiva, que conduce a la formación de hidróxido cálcico.

3.4.6. Reutilización de los catalizadores de CaO

Por lo general, una de las principales ventajas en la utilización de catalizadores heterogéneos con respecto a los homogéneos es la posibilidad de su reutilización. De acuerdo a los resultados recogidos en la Tabla 3.42 se puede llegar hasta los 20 reusos, manteniendo un elevado rendimiento, superior al 95%. Estos resultados recogidos en la Tabla 3.42 se representan en la Figura 3.34.

El catalizador para sus usos sucesivos se recupera tras la decantación de la mezcla de reacción, extrayendo los productos de reacción y dejando el catalizador sólido en el fondo del matraz, donde se introducen los reactivos para una nueva reacción. El periodo necesario para esta decantación es de dos horas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, a diferencia de los sistemas $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$, tras la primera reutilización, el catalizador mejora de forma considerable su comportamiento. Esto probablemente se debe a la obtención de una mínima hidratación, que como se ha comprobado en el epígrafe anterior, promueve un aumento notable en la actividad catalítica del CaO.

Tabla 3.42. Resultados obtenidos tras los usos sucesivos del mismo catalizador, 0.8 g de CaO, operando en las condiciones estándar: agitación constante de 700 rpm, empleando 12 mL de aceite de girasol, de viscosidad 32.0 cSt, 0.8g de CaO, 2.43 mL de metanol, operando durante 60 minutos a 65 °C de temperaturas.

Reuso	Viscosidad (cSt)	Selectividad (%)	Conversión (%)
1	14,81	56,75	68,60
2	4,60	98,58	100
3	4,89	95,65	100
4	5,50	99,63	100
5	5,68	99,75	100
6	5,05	98,47	100
7	5,60	98,78	100
8	5,48	98,93	100
9	4,80	98,48	100
10	5,15	98,93	100
11	8,32	90,75	100
12	9,70	94,19	100
13	7,31	95,12	100
14	7,03	93,15	100
15	5,64	99,28	100
16	6,98	98,57	100
17	6,50	98,87	100
18	4,10	99,90	100
19	4,15	99,37	100
20	9,33	96,44	100

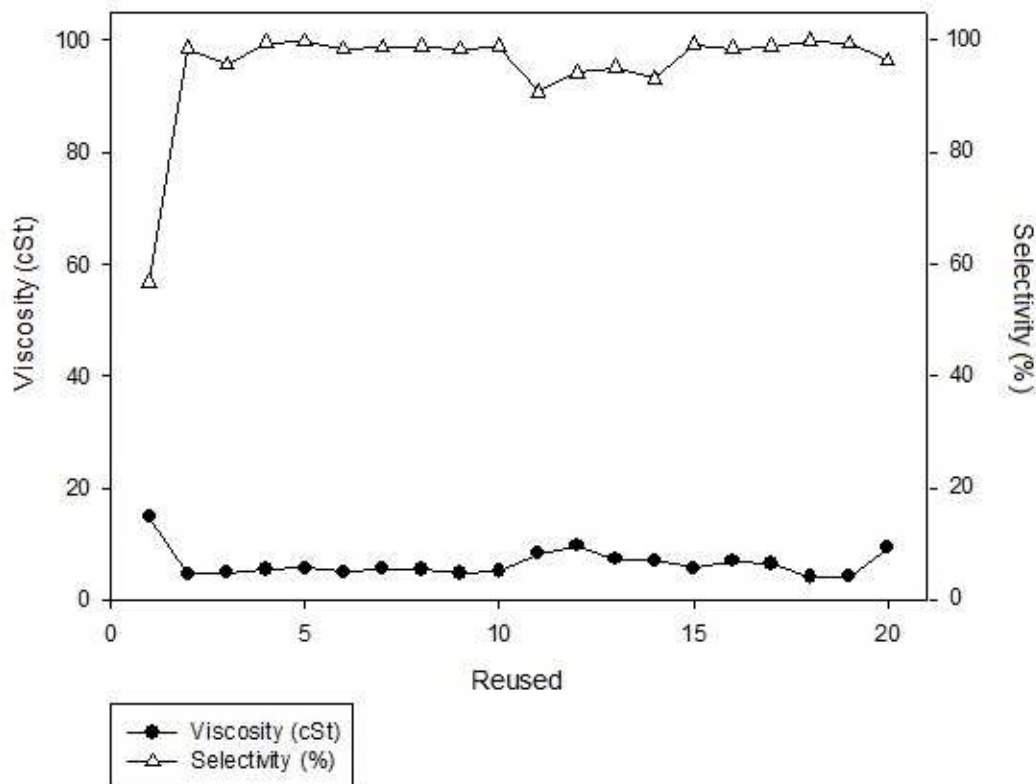


Figura 3.34. Comportamiento de los reusos de la reacción de transesterificación catalizada por el CaO, de acuerdo con los resultados recogidos en la Tabla 3.42.

Como se puede comprobar en la Figura 3.34, se pueden realizar 20 reutilizaciones operando con el mismo catalizador de CaO, con resultados de viscosidad inferiores al primer uso. Este comportamiento supone una importante doble ventaja, respecto a los sistemas KF soportados, ya que permiten no sólo una reutilización eficiente, sino que la actividad aumenta de manera considerable con su reuso.

Esto supone una gran ventaja ya que se reduce el coste del catalizador en al menos 20 veces, un precio ya de por sí muy inferior al de las lipasas.

3.4.7. Análisis de Multivarianza ANOVA

Se ha realizado un diseño experimental factorial multinivel con la finalidad de analizar la influencia de la temperatura, el peso del catalizador y la relación aceite/metanol, en la selectividad y viscosidad de los productos obtenidos en el proceso de metanolisis parcial del

aceite de girasol, aplicando al catalizador CaO en un proceso heterogéneo. Para ello se han fijado unos límites a cada variable y se ha estudiado el efecto de estas variables en la selectividad y la viscosidad cinemática de la mezcla final.

Los intervalos estudiados para el proceso realizado en las condiciones estándar empleadas en este estudio son: para el peso de catalizador CaO, desde 0.1 hasta 0.7g; la temperatura entre 45 y 65 °C y para las relaciones volumétricas aceite/metanol entre 12/1.6 y 12/2.4 mL/mL, lo que equivale a relaciones molares de 1/4 a 1/6 aproximadamente. Se ha fijado el tiempo de reacción en 60 minutos y una agitación constante de la reacción a 700 rpm para todas las reacciones del diseño experimental.

En la Tabla 3.43 se muestran los parámetros analizados en el diseño experimental, así como los valores usados como códigos en las matrices del análisis y sus correspondientes valores reales. Cada experimento se ha realizado por duplicado para asegurar la reproducibilidad de cada reacción y mejorar así el modelo.

Tabla 3.43. Parámetros analizados en el diseño factorial: códigos utilizados y valores reales.

Variables	Unidad	Niveles		
		-1	0	1
Temperature	° C	45	55	65
Amount CaO	g	0.1	0.4	0.7
Ratio methanol	mL/mL	12/1.6	-	12/2.4

El diseño realizado consta de 18 experimentos (*runs*) que son llevados a cabo por duplicado y en forma aleatoria para minimizar posibles errores. La secuencia de experimentos a realizar se muestra en la Tabla 3.44.

Una vez realizados los 36 experimentos correspondientes al diseño propuesto y obtenidos los resultados de los análisis de composición y viscosidad cinemática para cada reacción efectuada, se completó el mismo diseño con los datos experimentales (variables respuesta) y se realizó el análisis de los datos con el software Statgraphics® en su versión XVI centurion, el cual se vale de la aplicación de un método de análisis multivariable (ANOVA) para establecer las relaciones entre las variables en estudio.

Tabla 3.44. Matriz de experimentos del diseño factorial y las respuestas obtenidas para la selectividad y la viscosidad.

Run	Variables estudiadas			Variables de salida	
	Temperature (°C)	Amount CaO (g)	Ratio methanol (mL/mL)	Viscosity (cSt)	Selectivity (%)
1	0	0	-1	20,5	11,13
2	0	1	1	20,4	24,09
3	0	-1	-1	21,1	8,43
4	-1	1	1	19,9	13,43
5	-1	0	-1	21,2	9,05
6	1	-1	1	20,5	16,19
7	1	1	1	18,5	32,36
8	0	0	1	21,9	22,08
9	-1	1	-1	20,7	12,65
10	0	-1	1	21,9	7,85
11	-1	-1	1	19,2	5,68
12	0	1	-1	19,8	16,22
13	1	1	-1	15,2	25,62
14	-1	-1	-1	20,7	4,09
15	1	0	-1	17,2	13,05
16	-1	0	1	19,2	8,22
17	1	-1	-1	19,1	8,75
18	1	0	1	20,2	28,02

Repetición de experimentos				Viscosidad (cSt)	Selectividad (%)
Run	Temperatura (°C)	Peso (g)	Aceite/MeOH (mL/mL)		
19	1	0	1	19,1	27,82
20	1	-1	-1	17,9	7,85
21	-1	0	1	19,9	8,77
22	1	0	-1	16,6	15,33
23	-1	-1	-1	20,1	5,49
24	1	1	-1	15,5	26,05
25	0	1	-1	18,8	16,77
26	-1	-1	1	18,1	6,58
27	0	-1	1	20,3	8,57
28	-1	1	-1	19,5	12,56
29	0	0	1	20,2	21,8
30	1	1	1	18,2	33,26
31	1	-1	1	20,1	15,91
32	-1	0	-1	20,1	9,5
33	-1	1	1	18,7	14,33
34	0	-1	-1	20,5	8,34
35	0	1	1	19,5	24,9
36	0	0	-1	19,1	11,31

- **Resultados para viscosidad cinemática.**

Se ha estudiado la influencia de los principales parámetros de reacción en la viscosidad cinemática del biocombustible obtenido. Para ello se han realizado una serie de 18 experimentos por duplicado siguiendo un diseño experimental multifactorial, que mediante un análisis de la varianza, permitirá obtener la relación entre los principales parámetros de reacción (temperatura, peso y relación aceite/metanol) y la variable de salida Viscosidad cinemática.

En la Tabla 3.45 se muestran los resultados del análisis donde se pueden observar los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación.

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio, como se muestra en la Tabla 3.46.

Tabla 3.45. Efectos estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

<i>Effect</i>	<i>Estimate</i>	<i>Std. Error</i>	<i>V.I.F.</i>
average	20.5056	0.150368	
A:Temperature	-1.6	0.16472	1.0
B:Amount CaO	-1.23333	0.16472	1.0
C:Ratio Methanol	0.677778	0.134493	1.0
AA	-2.71667	0.285304	1.0
AB	-1.3625	0.20174	1.0
AC	1.86667	0.16472	1.0
BB	-0.516667	0.285304	1.0
BC	0.416667	0.16472	1.0
block	-0.833333	0.134493	1.0

Standard errors are based on total error with 26 d.f.

Tabla 3.46. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Temperature	815.034	1	815.034	206.39	0.0000
B:Amount CaO	918.968	1	918.968	232.71	0.0000
C:Ratio Methanol	264.984	1	264.984	67.10	0.0000
AA	0.0813389	1	0.0813389	0.02	0.8870
AB	87.7032	1	87.7032	22.21	0.0001
AC	118.104	1	118.104	29.91	0.0000
BB	3.6405	1	3.6405	0.92	0.3458
BC	8.96704	1	8.96704	2.27	0.1439
blocks	1.88147	1	1.88147	0.48	0.4962
Total error	102.675	26	3.94903		
Total (corr.)	2322.04	35			

R-squared = **95.5782**percent

R-squared (adjusted for d.f.) = **94.2681**percent

Standard Error of Est. = **1.98722**

Mean absolute error = **1.36774**

Durbin-Watson statistic = 2.22461 (P=0.6910)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.138716

La Tabla 3.47 muestra los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.47. Coeficientes de regresión para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Coefficient	Estimate
constant	20.5056
A:Temperature	-0.8
B:Amount CaO	-0.616667
C:Ratio Methanol	0.338889
AA	-1.35833
AB	-0.68125
AC	0.933333
BB	-0.258333
BC	0.208333

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Viscosity} = 20.5056 - 0.8 \cdot T - 0.616667 \cdot A + 0.338889 \cdot R - 1.35833 \cdot T^2 - 0.68125 \cdot T \cdot A + 0.933333 \cdot T \cdot R - 0.258333 \cdot A^2 + 0.208333 \cdot A \cdot R$$

T: temperature. A: amount CaO. R: ratio oil/methanol.

En la Tabla 3.48 se recogen los valores óptimos de los parámetros para obtener las condiciones concretas en las cuales se reduce la viscosidad al valor mínimo.

Tabla 3.48. Parámetros de los factores para minimizar la viscosidad y valor de la viscosidad.

Valor óptimo	15.3104cSt		
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Temperature	-1	1	1
Amount CaO	-1	1	1
Ratio Methanol	-1	1	-1

De acuerdo con los resultados obtenidos las condiciones óptimas de operación serán:

- ✓ Temperatura de reacción.:65 °C
- ✓ Peso de catalizador: 0.7 g
- ✓ Relación molar aceite/metanol: 4/1 correspondiente a 12 mL aceite y 1.6 mL de metanol.

Una vez efectuadas las reacciones en las condiciones establecidas los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.49, para comprobar la precisión del teórico con el experimental obtenido en esas condiciones.

Tabla 3.49. Reacciones efectuadas en el análisis de varianza ANOVA.

Experimento	Temperatura (°C)	Peso catalizador(g)	Ratio molar	Viscosidad (cSt)
13	65	0,7	1/2	15,2
24	65	0,7	1/2	15,5

Los resultados previstos de la Tabla 3.48 por el análisis Anova indican una muy buena concordancia.

En la Tabla 3.50 se muestran los valores experimentales obtenidos para cada reacción del diseño experimental para la viscosidad cinemática a 40 °C frente a los valores ajustados por el modelo obtenido, observándose las diferencias entre los valores reales y ajustados según el modelo.

Tabla 3.50. Resultados Estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

	<i>Observed</i>	<i>Fitted</i>
<i>Row</i>	<i>Value</i>	<i>Value</i>
1	20.5	20.5833
2	20.4	20.5944
3	21.1	21.15
4	19.9	19.784
5	21.2	20.9583
6	20.5	20.8674
7	18.5	18.6882
8	21.9	21.2611
9	20.7	20.5563
10	21.9	21.4111
11	19.2	19.2382
12	19.8	19.5
13	15.2	15.7271
14	20.7	20.8438
15	17.2	17.4917
16	19.2	19.7694
17	19.1	18.7396
18	20.2	20.0361
19	19.1	19.2028
20	17.9	17.9063
21	19.9	18.9361
22	16.6	16.6583
23	20.1	20.0104
24	15.5	14.8938
25	18.8	18.6667
26	18.1	18.4049
27	20.3	20.5778
28	19.5	19.7229
29	20.2	20.4278

30	18.2	17.8549
31	20.1	20.034
32	20.1	20.125
33	18.7	18.9507
34	20.5	20.3167
35	19.5	19.7611
36	19.1	19.75

A continuación se presenta el diagrama de Pareto (Figura 3.35), en el cual se puede observar claramente cuáles son los factores que influyen de manera estadísticamente significativa en la viscosidad. En este caso, la variable más influyente es la temperatura, seguida del peso de catalizador (CaO) y del relación aceite/metanol, en orden decreciente de importancia. Es de destacar que tanto el peso de catalizador como la relación aceite/metanol tienen una influencia positiva, de modo que al aumentar estas magnitudes se produce una disminución en la viscosidad, ya que la finalidad es minimizar la viscosidad.

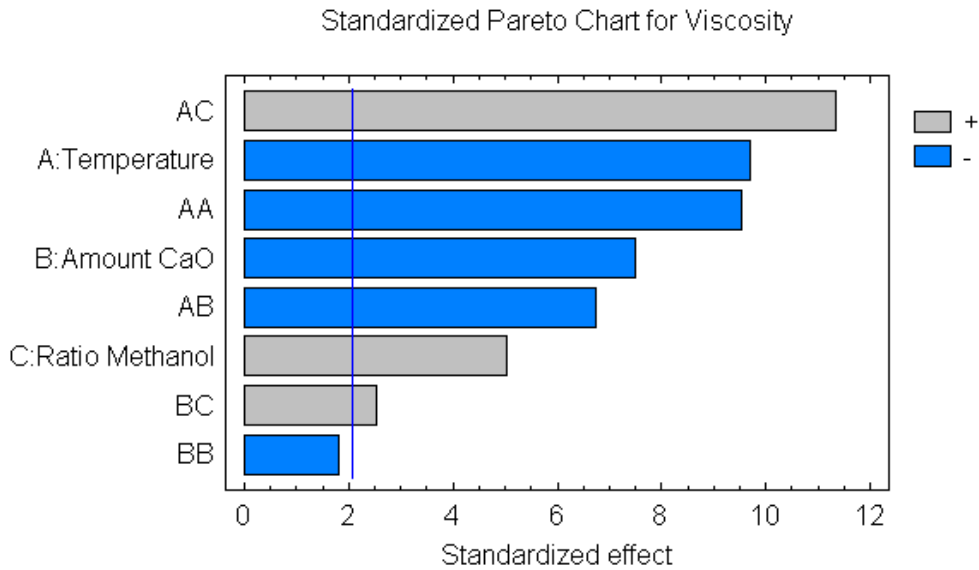


Figura 3.35. Gráfico de pareto para la viscosidad.

Pueden también observarse en la Figura 3.36, los efectos principales. En este gráfico se deduce fácilmente como una pendiente positiva indica un efecto positivo en la conversión (reduciendo así la viscosidad). Por tanto, se observa aquí y de manera complementaria a la Figura 3.35, cómo la temperatura es el parámetro con mayor significancia estadística en la conversión.

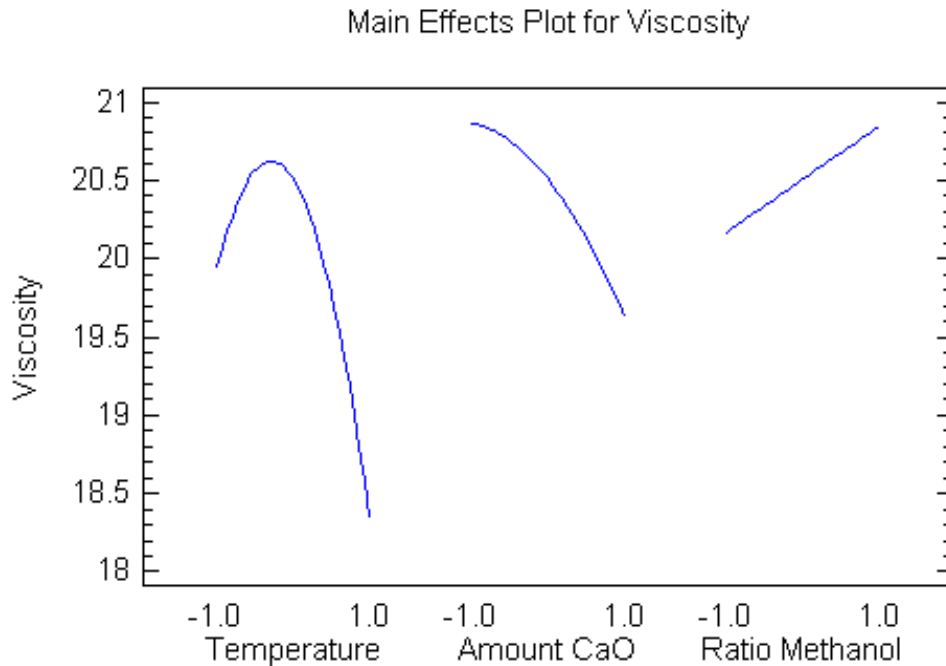


Figura 3.36. Representación gráfica del efecto de los diferentes factores analizados sobre la viscosidad.

En la Figura 3.37, se muestra la superficie de respuesta obtenida para el modelo estadístico creado para el sistema en estudio y para la variable de salida viscosidad. El ajuste del modelo es bueno, con unos valores de R^2 del 95.578 %, lo cual indica una buena correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo creado, como puede verse en la Figura 3.38.

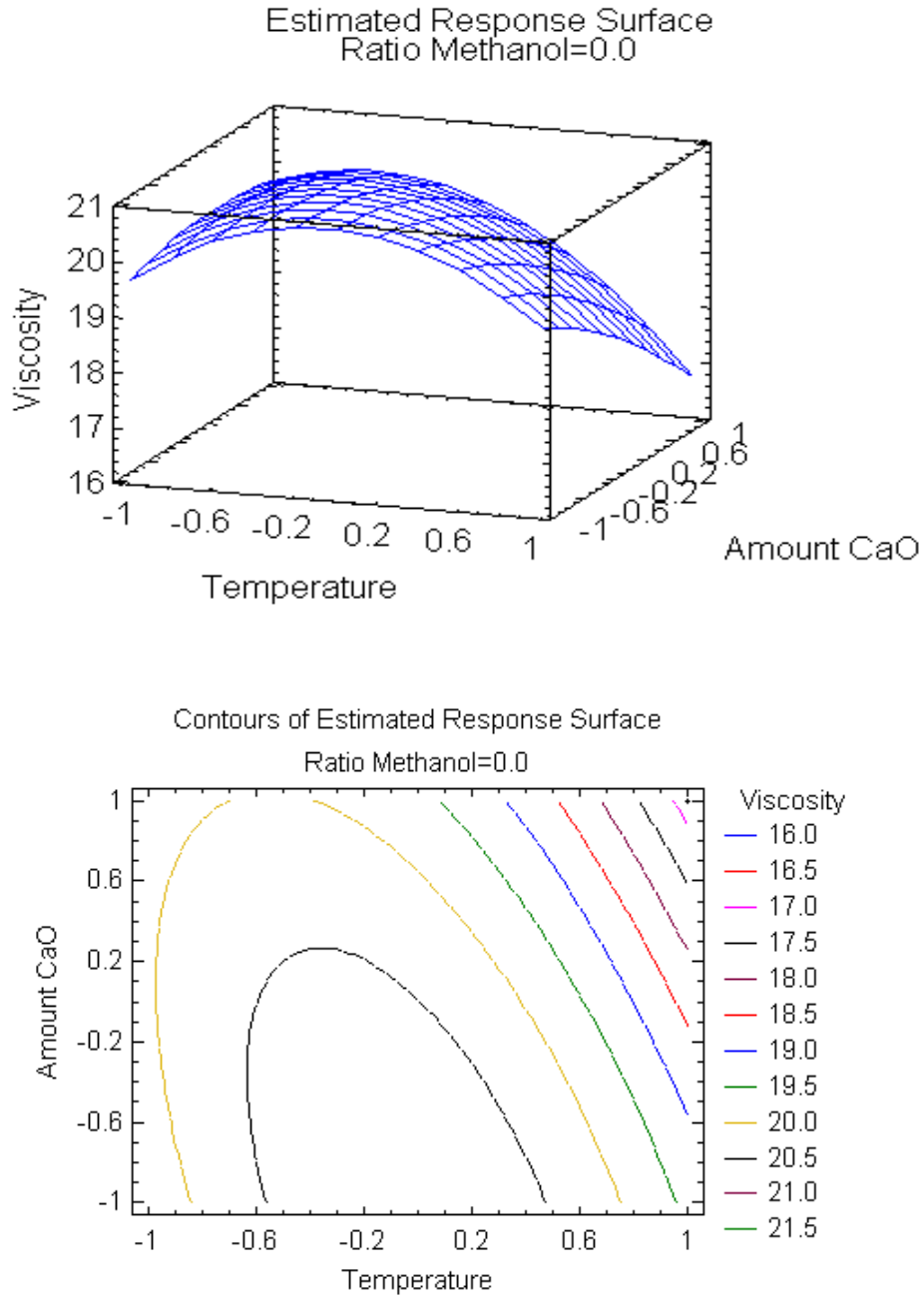


Figura 3.37. Superficie de respuesta estimada con parámetros influyentes como la viscosidad cinemática frente a temperatura y aceite/metanol frente al peso.



Figura 3.38. Gráfico de probabilidad de la viscosidad.

Por tanto, puede concluirse que el modelo creado para correlacionar las variables de reacción (peso de catalizador, relación molar aceite/metanol y temperatura) con la viscosidad es aceptable y explica la variabilidad producida en la viscosidad.

- **Resultados para selectividad.**

Se ha estudiado la influencia de los principales parámetros de reacción en la viscosidad cinemática del biocombustible obtenido. Para ello se han realizado una serie de 18 experimentos (por duplicado) siguiendo un diseño experimental multifactorial, que mediante un análisis de la varianza, permitirá obtener la relación entre los principales parámetros de reacción (temperatura, peso y relación aceite/metanol) y la variable de salida Selectividad.

En la Tabla 3.51 se muestran los resultados del análisis donde se pueden observar los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación.

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio (Tabla 3.52).

Tabla 3.51. Efectos estimados para la variable de salida Selectividad.

<i>Effect</i>	<i>Estimate</i>	<i>Stnd. Error</i>	<i>V.I.F.</i>
average	15.5739	0.740592	
A:Temperature	11.655	0.811278	1.0
B:Amount CaO	12.3758	0.811278	1.0
C:Ratio Methanol	5.42611	0.662405	1.0
AA	-0.201667	1.40517	1.0
AB	4.6825	0.993608	1.0
AC	4.43667	0.811278	1.0
BB	-1.34917	1.40517	1.0
BC	1.2225	0.811278	1.0
block	0.457222	0.662405	1.0

Standard errors are based on total error with 26 d.f.

Tabla 3.52. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de salida Selectividad.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Temperature	15.36	1	15.36	94.35	0.0000
B:Amount CaO	9.12667	1	9.12667	56.06	0.0000
C:Ratio Methanol	4.13444	1	4.13444	25.40	0.0000
AA	14.7606	1	14.7606	90.67	0.0000
AB	7.42562	1	7.42562	45.61	0.0000
AC	20.9067	1	20.9067	128.42	0.0000
BB	0.533889	1	0.533889	3.28	0.0817
BC	1.04167	1	1.04167	6.40	0.0178
blocks	6.25	1	6.25	38.39	0.0000
Total error	4.23271	26	0.162796		
Total (corr.)	83.7722	35			

R-squared = **94.9474**percent

R-squared (adjusted for d.f.) = **93.4503**percent

Standard Error of Est. = **0.40348**

Mean absolute error = **0.268943**

Durbin-Watson statistic = 1.77918 (P=0.1982)

Lag 1 residual autocorrelation = 0.0596809

A continuación se muestra la Tabla 3.53, donde se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.53. Coeficientes de regresión para la variable de salida Selectividad.

<i>Coefficient</i>	<i>Estimate</i>
constant	15.5739
A:Temperature	5.8275
B:Amount CaO	6.18792
C:Ratio Methanol	2.71306
AA	-0.100833
AB	2.34125
AC	2.21833
BB	-0.674583
BC	0.61125

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Selectivity} = 15.5739 + 5.8275*T + 6.18792*A + 2.71306*R - 0.100833*T^2 + 2.34125*T*A + 2.21833*T*R - 0.674583*A^2 + 0.61125*A*R$$

T: temperature. A: amount CaO. R: ratio oil/methanol.

En la Tabla 3.63 se recogen los valores óptimos de los parámetros para obtener las condiciones concretas en las cuales se incrementa la selectividad al valor máximo.

Tabla 3.63. Parámetros de los factores para maximizar la selectividad y valor de la selectividad.

Valor óptimo	34.6978 %		
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Temperature	-1.0	1.0	1.0
Amount CaO	-1.0	1.0	1.0
Ratio Methanol	-1.0	1.0	1.0

De acuerdo con los resultados obtenidos las condiciones óptimas de operación serán:

- ✓ Temperatura de reacción: 65 °C
- ✓ Peso de catalizador: 0.7 g
- ✓ Relación molar aceite/metanol: 4/1 correspondiente a 12 mL aceite y 2.4 mL de metanol.

En la Tabla 3.55 se muestran los valores experimentales obtenidos para cada reacción del diseño experimental para la viscosidad cinemática a 40 °C frente a los valores ajustados por el modelo obtenido, observándose las diferencias entre los valores reales y ajustados según el modelo.

Tabla 3.55. Resultados Estimados para la variable de salida Selectividad.

	<i>Observed</i>	<i>Fitted</i>
<i>Row</i>	<i>Value</i>	<i>Value</i>
1	11.13	12.6322
2	24.09	24.1829
3	8.43	6.38097
4	13.43	13.695
5	9.05	8.92222
6	16.19	16.1883
7	32.36	34.4692
8	22.08	18.0583
9	12.65	11.4831
10	7.85	10.5846
11	5.68	4.77917
12	16.22	17.5343
13	25.62	23.3839
14	4.09	5.01222
15	13.05	16.1406
16	8.22	9.91167
17	8.75	7.54806
18	28.02	26.0033

19	27.82	26.4606
20	7.85	8.00528
21	8.77	10.3689
22	15.33	16.5978
23	5.49	5.46944
24	26.05	23.8411
25	16.77	17.9915
26	6.58	5.23639
27	8.57	11.0418
28	12.56	11.9403
29	21.8	18.5156
30	33.26	34.9264
31	15.91	16.6456
32	9.5	9.37944
33	14.33	14.1522
34	8.34	6.83819
35	24.9	24.6401
36	11.31	13.0894

A continuación se presenta el diagrama de Pareto (Figura 3.39), en el cual se puede observar claramente cuáles son los factores que influyen de manera estadísticamente significativa en la viscosidad. En este caso, la variable más influyente es la temperatura, seguida del peso de catalizador (CaO) y de la relación aceite/metanol, en orden decreciente de importancia. Es de destacar que todas las variables tienen una influencia positiva, de modo que al aumentar estas magnitudes se produce un aumento de la selectividad, ya que la finalidad es maximizar la selectividad.

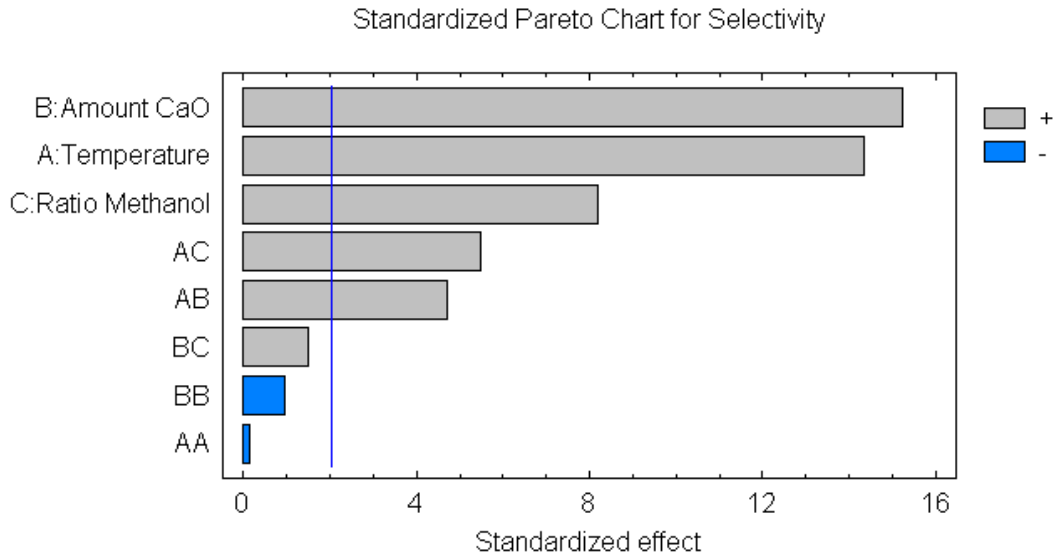


Figura 3.39. Gráfico de Pareto para la selectividad.

Pueden también observarse en la Figura 3.40, los efectos principales. En este gráfico se deduce fácilmente como una pendiente positiva indica un efecto positivo en la conversión (aumentando del mismo modo la selectividad), así como un mayor valor de la pendiente indica un efecto más acusado y viceversa. Por tanto se observa aquí y de manera complementaria a la Figura 3.39, como la cantidad de CaO es el parámetro con mayor significancia estadística en la conversión.

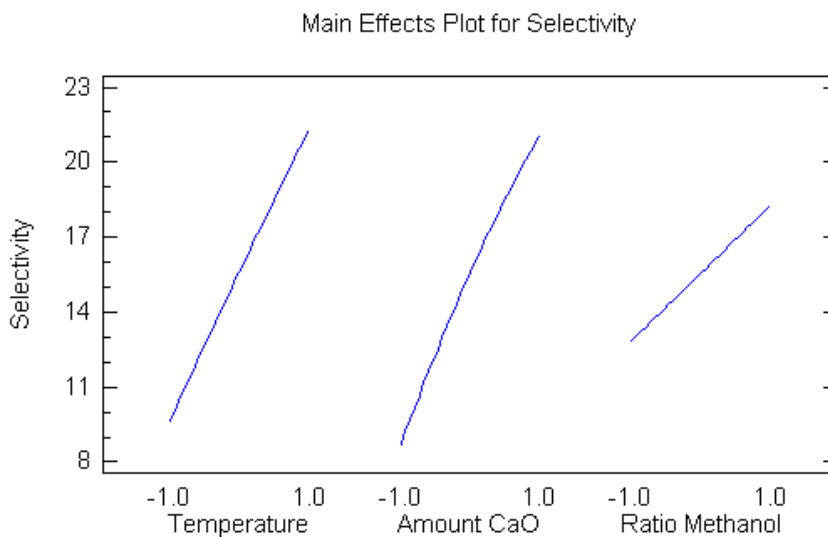


Figura 3.40. Gráfico del efecto de los diferentes factores sobre la selectividad.

En la Figura 3.41, se muestra la superficie de respuesta obtenida para el modelo estadístico creado para el sistema en estudio y para la variable de salida viscosidad. El ajuste del modelo es bueno, con unos valores de R^2 del 94.947 %, lo cual indica una buena correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo creado, como puede verse en la Figura 3.42.

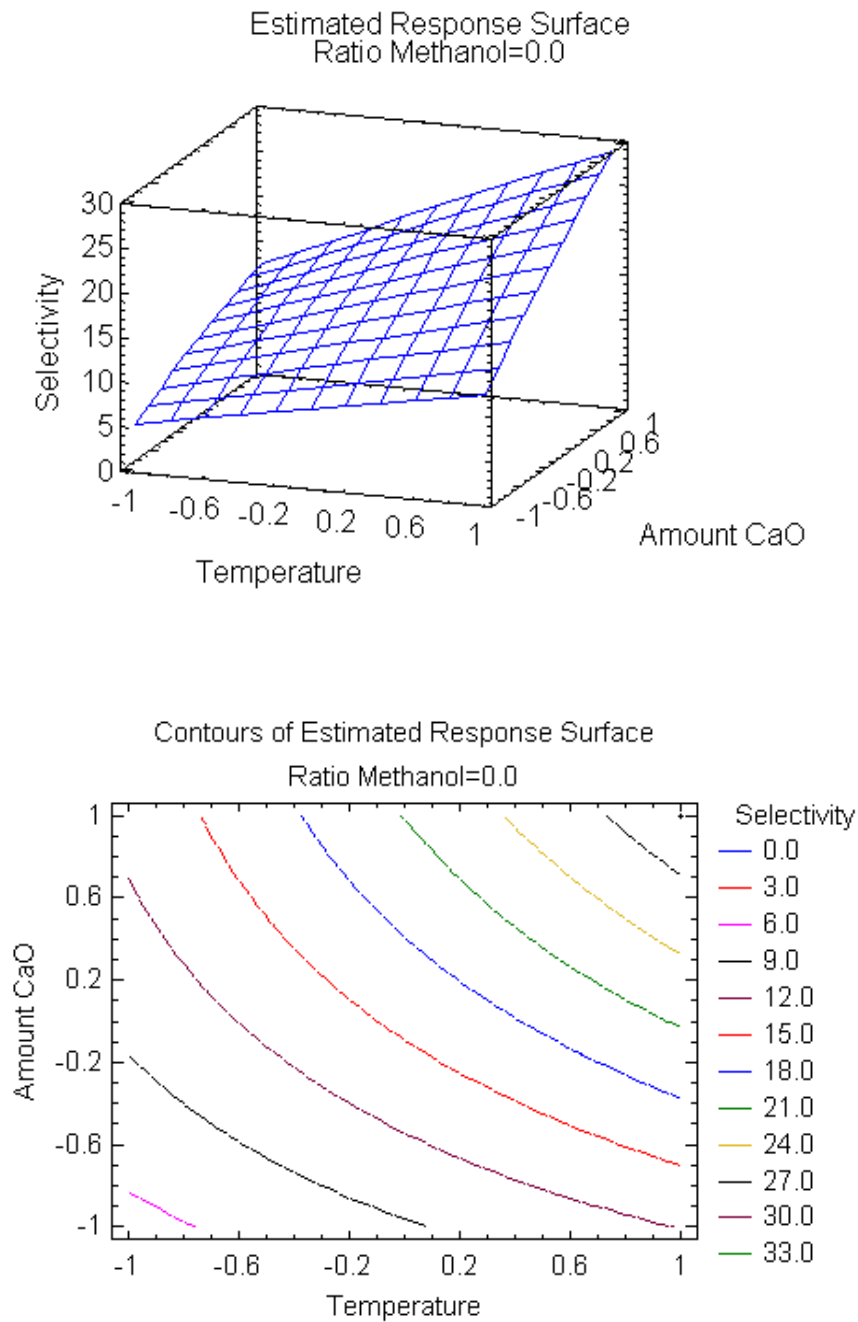


Figura 3.41. Superficie de respuesta estimada con parámetros influyentes como la selectividad frente a temperatura y aceite/metanol frente al peso.

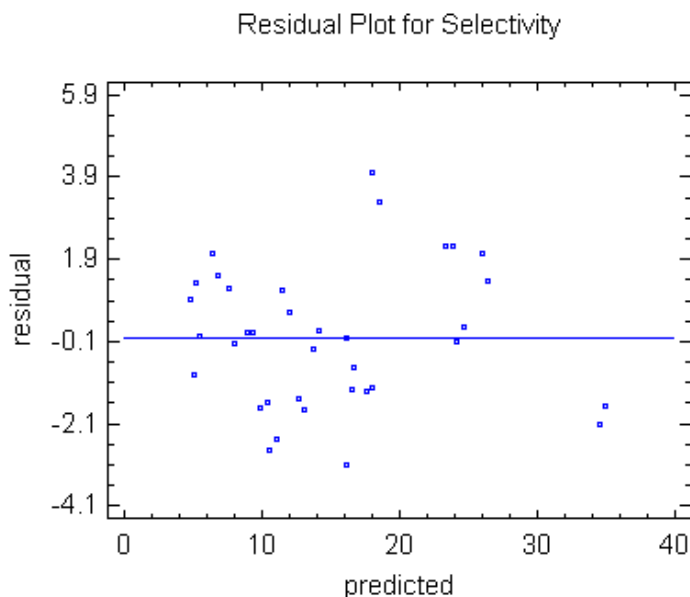


Figura 3.42. Gráfico de probabilidad de la selectividad.

Por tanto, puede concluirse que el modelo creado para correlacionar las variables de reacción (peso de catalizador, relación molar aceite/metanol y temperatura) con la selectividad es aceptable y explica la variabilidad producida en la selectividad.

De acuerdo a los resultados obtenidos empleando CaO en el proceso de metanolisis parcial del aceite de Girasol, podemos decir que el catalizador reúne todos los requisitos para ser una alternativa adecuada al empleo de lipasas comerciales, libres o inmovilizadas. En este sentido hay que destacar que presenta valores similares de selectividad y viscosidad a los descritos cuando se emplean lipasas. No generando, en las condiciones investigadas, ninguna cantidad de glicerina en forma libre.

Además, hay que destacar dos aspectos muy relevantes, en primer lugar es un catalizador de un costo mínimo, pero sobre todo, su mayor fortaleza, está en la posibilidad de su reutilización. Se ha investigado el uso sucesivo del catalizador a lo largo de veinte reacciones, posiblemente pudiera emplearse más veces aún. Pero este nivel de reutilización reduce el costo de forma definitiva, para que su empleo no suponga una limitación al procedimiento. Esto no puede afirmarse con los sistemas KF soportados, debido a la limitación en el número de reusos o a las lipasas, debido a su costo inicial mucho mayor.

4. CONCLUSIONES

En la presente investigación, relativa a la obtención eficiente de un biocombustible capaz de sustituir, total o parcialmente, al diesel fósil en los motores actuales, sin realizar modificación alguna en los mismos, ha dado lugar una revisión bibliográfica complementaria [8] con el fin de situar esta investigación en el escenario más actual posible. Fruto de esta investigación bibliográfica podemos avanzar las siguientes conclusiones:

- La situación actual puede describirse como de transición, entre una época en la que el petróleo era una materia de fácil acceso y muy bajo costo, en la que no sólo la energía y los combustibles, también múltiples productos químicos, hoy insustituibles en la vida diaria, se desarrollaron a partir de esta fuente fósil (y por tanto no renovable) y un futuro previsible, en el que los recursos fósiles no sean tan fácilmente accesibles, por el agotamiento de las reservas de más fácil acceso, dado que cada vez es menor la cantidad de petróleo disponible y su extracción es más compleja.
- Junto a esto, se constata la existencia de un deterioro creciente del medio ambiente mundial y el aumento de una demanda creciente de combustibles fósiles por las economías emergentes. Este escenario actual obliga al desarrollo de nuevas rutas para producir compuestos químicos de amplio uso, energía y combustibles mediante procesos de carácter renovable, para sustituir de forma ordenada todos aquellos productos, incluyendo los combustibles, hasta ahora producidos mediante recursos fósiles.
- De hecho, los biocombustibles de carácter renovable, obtenidos a partir de aceites o grasas, manifiestan una notable capacidad para reducir las emisiones contaminantes, dado que al posibilitar un mejor funcionamiento del motor en la combustión, producen comparativamente mucho menos monóxido de carbono, dióxido de azufre e hidrocarburos no quemados, que el combustible diesel obtenido del petróleo. Por lo tanto, los biocombustibles podrían desempeñar un papel esencial para alcanzar los objetivos previstos por los países social y económicamente más avanzados, en las tasas previstas para reemplazar los combustibles de transporte a base de petróleo.
- Por tanto, no sólo es prioritario el desarrollo de tecnologías alternativas mediante la sustitución de combustibles fósiles, que permitan la reducción de emisiones, sino que también es imprescindible adoptar políticas que promuevan las fuentes de energía

renovables, que sean capaces de reducir paulatinamente la dependencia de las reservas fósiles y también para mantener la sostenibilidad ambiental y económica. Este proceso debería comenzar tan pronto como sea posible y de manera suave y gradual, teniendo en cuenta su carácter renovable y así evitar cambios bruscos en los precios del mercado que podría activar una crisis energética no deseada.

- Dado que porcentualmente, el mayor consumo de petróleo se efectúa en la producción de combustibles, su sustitución por los denominados biocombustibles, constituye una alternativa muy adecuada para reducir el consumo de petróleo fósil y disminuir de forma apreciable las emisiones de gases de efecto invernadero. Así, debe constituir una prioridad medioambiental de primer orden la sustitución de los combustibles actuales, a base de petróleo de origen fósil, por productos de carácter renovable que permitan el funcionamiento de los actuales motores diesel, sin necesidad de efectuar modificaciones en estos motores.
- Sin embargo, la opción tecnológica para la producción masiva de biocombustibles, capaz de reemplazar una cantidad apreciable del petróleo actualmente consumido, no podría basarse en el actual biodiesel convencional, regulado por la normativa EN 14214. Esto se debe a las importantes dificultades económicamente objetivas, relacionadas con la producción de ingentes cantidades de glicerina residual (de baja pureza), y a la necesidad de implementar costosos procedimientos de limpieza del biocombustible, a fin de reducir la cantidad de glicerina que queda retenida en la mezcla de FAMEs, que normativamente debe quedar por debajo del 0.02%. De hecho, se supone que el retraso en la introducción de los biocombustibles alternativos está asociado con la dificultad de obtener biodiesel de acuerdo con la norma EN 14214, que se contempla como mezclas de FAME, con límites estrictos de glicerina.
- De entre las tecnologías actualmente descritas, que permiten producir biocombustibles a partir de aceites o grasas de carácter renovable, sin generar glicerina, destacan los Biocombustibles obtenidos por hidro-procesamiento de aceites y grasas en las plantas de refino de petróleo actuales. Estos productos se denominan genericamente Green Diesel. Se trata de los mismos hidrocarburos que componen el diesel convencional, sin contener derivados que generen azufre en su combustión. Junto a este tipo de procesos, se han descrito otros metodologías que producen biocombustibles del tipo del biodiesel

convencional, producidos mediante la obtención de diversos derivados del glicerol en el mismo proceso de transesterificación de aceites y grasas.

- Para la producción de derivados del glicerol, en el mismo proceso de transesterificación de los aceites y grasas, destacan el empleo de acetato de metilo o etilo, que da lugar al triacetato de glicerol o acetina, generando un biocombustible patentado con el nombre de Gliperol® y del carbonato de dimetilo, gerando el correspondiente carbonato de glicerina, que acompaña a los FAMES, produciendo un biocombustible patentado con el nombre de DMC-bioD®. Junto a estos nuevos biocombustibles se encuentra el denominado Ecodiesel®, patentado por la UCO, formado por una mezcla de ésteres metílicos o etílicos y los correspondientes monoglicéridos. Este biocombustible se ha obtenido mediante la etanolisis enzimática selectiva de los aceites y grasas empleando diversas lipasas.

En base a la metodología enzimática patentada por la universidad de Córdoba, que evita la producción de glicerina, en el proceso de obtención del biocombustible, manteniéndola en forma de monoglicérido, se ha realizado el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral. El objetivo de estas investigaciones se ha dirigido a implementar la viabilidad técnica y económica de este proceso, mediante su aplicación en forma heterogénea, tanto mediante la aplicación de biocatalizadores, constituidos por lipasas inmovilizadas, como al estudio de la viabilidad del proceso selectivo, controlado cinéticamente, mediante la utilización de catalizadores básicos heterogéneos. Los principales resultados experimentales y las conclusiones obtenidas al respecto, durante el desarrollo de la investigación realizada, se detallan a continuación:

- Las condiciones de reacción han sido optimizadas para hacer posible la producción de un biocombustible que no genera glicerina, mediante el uso de diferentes catalizadores heterogéneos, tanto enzimáticos, constituido por la lipasa inmovilizada *Rhizomucor miehei* de Novozyme, como de diferentes sólidos de carácter básico, bien catalizadores de KF soportado, en tres diferentes soportes inorgánicos: MgO, Al₂O₃ y ZnO, así como del CaO.
- Se ha puesto a punto un procedimiento cromatográfico que permite identificar, sin ningún género de duda, los diferentes componentes de la mezcla de FAMES o FAEEs, y los monoglicéridos, que constituyen los biocombustibles investigados, a la vez que se puede

confirmar la ausencia de glicerina en los productos de la reacción obtenidos, en las condiciones de operación investigadas.

- Los estudios realizados empleando la lipasa *Rhizomucor miehei* de Novozyme, una lipasa *Rhizomucor miehei* inmovilizada en un polímero orgánico, sólo permitió realizar seis reúsos, de rendimiento decreciente, debido a la elevada viscosidad del medio de reacción y a la baja densidad del biocatalizador, que dificulta la separación del sólido heterogéneo, obligando a realizar un centrifugado del producto de reacción para recuperar el sólido catalítico. Esta operación de centrifugado encarece el proceso de forma notable. Las investigaciones realizadas han permitido optimizar un método de inmovilización física del catalizador *Rhizomucor miehei* de Novozyme previamente heterogeneizado, mediante su dispersión (al 5% en peso) en Sílica Gel. De esta forma, mediante la simple inmovilización por retención física no sólo permite recuperar muy fácilmente el sólido biocatalítico sin necesidad de centrifugación, sino que se incrementa considerablemente su eficiencia, ya que tras las 15 reutilizaciones investigadas no se percibe ningún deterioro en el funcionamiento del sistema enzimático. Esto permite suponer que es posible realizar un número mucho mayor de reúsos. En base a estos resultados es posible concluir que este procedimiento de retención física puesto a punto mejora de forma muy apreciable la viabilidad técnica y económica del procedimiento enzimático para la obtención de Ecodiesel.
- Se ha evaluado el comportamiento catalítico de sistemas KF soportados en tres sólidos inorgánicos. Con los tres sistemas investigados, KF/Al₂O₃, KF/ZnO y KF/MgO se obtienen muy buenos resultados cuando se realiza la primera reacción. Pero en los siguientes reúsos se obtiene muy rápidamente la desactivación del catalizador. Los catalizadores de KF/ZnO y KF/MgO permiten una segunda reutilización, con un comportamiento catalítico similar al de la primera reacción, y también presentan una disminución más suave en la conversión y el rendimiento que con el catalizador KF/Al₂O₃. La poca eficiencia en la reutilización de estos sistemas heterogéneos es la principal limitación que presenta este tipo de catalizadores.
- Los resultados obtenidos al emplear CaO como catalizador básico heterogéneo ponen de manifiesto que, a diferencia de los sistemas KF soportados, tras la primera reutilización, el catalizador mejora de forma ostensible su comportamiento. Esto probablemente se deba a

la obtención de una mínima hidratación, que como se ha comprobado al investigar el efecto de pequeñas cantidades de agua en el medio, promueve un aumento notable en la actividad catalítica del CaO. Es decir, la presencia de una pequeña cantidad de agua es beneficiosa, en el sentido de que se incrementa tanto la actividad catalítica de los centros activos como el propio número de centros. Mayor cantidad de agua produce por el contrario una caída de la actividad catalítica.

- De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que se pueden realizar al menos 20 reutilizaciones, operando con el mismo catalizador de CaO, con resultados de viscosidad inferiores al del primer uso. Este comportamiento supone una importante doble ventaja, respecto a los sistemas KF soportados, ya que permiten no sólo una reutilización eficiente, sino que la actividad aumenta de manera apreciable con su reuso. Esto supone una apreciable reducción en el costo del catalizador, no sólo respecto a los restantes sistemas heterogéneos investigados enzimáticos o alcalinos, sino incluso respecto a los sistemas convencionales homogéneos.

- Se ha comprobado la influencia del contenido de agua en el medio de reacción (para determinar la posibilidad del uso de aceite usado, caracterizado por el contenido en agua), en los diferentes catalizadores, obteniendo malos resultados para la lipasa; y en el KF/Al₂O₃ y en el CaO hasta el 0,2 % con respecto al aceite. De acuerdo con estos resultados, parece conveniente realizar un tratamiento previo de eliminación del agua, que suelen contener los aceites reciclados de uso domestico, antes de su tratamiento para su transformación en Ecosdiesel, por alguno de los procedimientos investigados. Sin embargo, es previsible que no se produzca ningún problema al ser aplicado con aceites (comestibles o no) provenientes de cualquier otro tipo de semillas, siempre que estén adecuadamente refinados y sobre todo completamente libres de agua.

- Se han realizado dos modelos estadísticos con el software Statgraphic XVI centurion, para la lipasa *Rhizomucor miehei* soportada en Silicagel y con el CaO (tanto la viscosidad como la selectividad), obteniendo en ambos casos buena correlación, pero algo más baja en la selectividad.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el CaO, como catalizador heterogéneo del proceso de metanolisis parcial del aceite de Girasol, reúne todos los requisitos

para ser una alternativa adecuada al empleo de lipasas comerciales, libres o inmovilizadas, en la producción de Ecodiesel de una forma eficiente desde el punto de vista económico y tecnológico. Esto se debe a que el control cinético del proceso es capaz de conseguir los mismos resultados que los que consigue el proceso estéreoselectivo de las lipasas. En este sentido hay que destacar que presenta valores similares de conversión, selectividad y viscosidad a los descritos cuando se emplean lipasas, no generando ninguna cantidad de glicerina en forma libre, en las condiciones investigadas. Además, hay que destacar que es un catalizador heterogéneo de un costo mínimo, que permite un elevado número de reutilizaciones. En base a estos resultados es posible concluir que este procedimiento de catálisis heterogénea basada en el uso de CaO supone un importante avance en la viabilidad técnica y económica para la producción de Ecodiesel, un biocombustibles del tipo del biodiesel convencional, que retiene el glicerol en forma de monoglicéridos.

CONCLUSIONS

This research is based on the production of a biofuel available to replace the diesel in the current engine (without any modification) [8]. We have done a review about current situation of the fuels and biofuels:

- Nowadays, there is a changing time from an easy and cheap obtention of the fuel to a hard and expensive obtention of the fuel.
- Besides, currently there is a huge problem with the environmental and an increase of the use the diesel. Thus, it is necessary to describe new ways to produce chemical products useful to use like fuel.
- In fact, the renewable biofuel (from oil or fat), can reduce the greenhouse gases emission because do not emit carbon monoxide, sulphur dioxide and hydrocarbon not burnt.
- This process should begin soft and gradually to avoid huge changes in the prices and to produce of this way a new crisis.
- The major utilization of the petrol is to produce fuel, thus the change for renewable biofuel could be a good way to reduce the greenhouse gases emission and to avoid the modifications in the current engines.
- However, the production of the conventional biodiesel (EN 14214) cannot replace the fuel because is too expensive and generate a huge amount of glycerol (of low quality). Exist a limit of glycerol permitted of 0.02%, thus is necessary to eliminate the glycerol with a washing operation which increase the price.
- It is noteworthy the biofuels obtained for hydro-process of oil and fat in the current petrol companies, called Green Diesel. The Green Diesel is like the diesel, but not generates sulphur in its combustion.
- Also, there are others process to produce biofuels from glycerol derivates like the Glicerol®, generating dimethyl carbonate such as the DMC-bioD® or stopping the transesterification reaction in the second step like the Ecodiesel® (patented by the University of Cordoba).

Based on this methodology (patented by the University of Córdoba), which does not generate glycerin in biofuel production. The results obtained during the development of the research presented in this thesis are detailed below:

- Reaction conditions have been optimized to produce a biofuel which does not generate glycerol in their composition, by using different catalysts (*Rhizomucor miehei* immobilized lipase, 3 KF supported catalysts and CaO pure).
- A method to verify chromatographically the absence of glycerol and to determinate the FAMES and FAEEs composition has been developed.
- The studies about the *Rhizomucor miehei* lipase from Novozyme permitted 6 reuses and being supported on silica (5 % in weight) the reuses was increased to 15 without any reduction in the activity of the biocatalyst.
- We have immobilized KF catalyst on three inorganic supports (Al₂O₃, ZnO and MgO), obtaining good results in the first reaction, but poor activity from the second reaction.
- The reactions with the CaO show very good results in the reutilizations because the CaO can be used 20 times with better viscosity than in the first reaction.
- We have proved the influence about the content of water in the reaction medium (to determine the possibility of using waste oil, characterized by its water content), for the different catalysts, giving poor results for lipase, and around the 0.2% over oil in the KF/Al₂O₃ and the CaO.
- We have made two statistical models with Statgraphic XVI centurion software for *Rhizomucor miehei* lipase supported on silica and with the CaO (based on the viscosity and the selectivity), obtaining good correlation in both cases.

According of the results obtained, we can conclude that the calcium oxide has all requirements to be a good alternative to the lipases in the Ecodiesel production, being cheaper than the lipases. Besides, the CaO is really cheap and can be reused a huge number time (at

least 20 times). In summary, this results show that the CaO is the best catalyst to produce biofuel that integrates the glycerol in its composition.

5. REFERENCIAS

- [1] **Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasad S, Banerjee UC.** Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew Sust Energy Rev*; 13 (2009) 2361–2372.
- [2] **Singh A, Nigam PS, Murphy JD.** Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresour Technol*; 102 (2011) 10–16.
- [3] **Chen D, Liu CJ.** A Current Perspective on Catalysis for New Energy Technologies. *Chem Cat Chem*; 3 (2011) 423-425.
- [4] **Li Q, Guo B, Yu J, Ran J, Zhang B, Yan H, Gong J.** Highly Efficient Visible-Light-Driven Photocatalytic Hydrogen Production of CdS-Cluster-Decorated Graphene Nanosheets. *J. Am. Chem. Soc*: 133 (2011) 10878-10884.
- [5] **Dhar A, Kevin R, Agarwal AK.** Production of biodiesel from high-FFA neem oil and its performance, emission and combustion characterization in a single cylinder DICl engine. *Fuel Process Technol*; 97 (2012) 118–129.
- [6] **Yusuf N.N.A.N, Kamarudin S.K., Yaakub Z.** Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Convers Manage*; 52 (2011) 2741-2751.
- [7] **Borges ME, Díaz L.** Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. *Renew Sust Energy Rev*; 16 (2012) 2839– 2849.
- [8] **Calero J, Luna D, Sancho ED, Luna C, Bautista FM, Romero AA, Posadillo A, Berbel J, Verdugo-Escamilla C.** An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42 (2015) 1437–1452.
- [9] **Smith B, Greenwell HC, Whiting A.** Catalytic Upgrading of Tri-glycerides and Fatty Acids to Transport Biofuels. *Energy Environ Sci*; 2 (2009) 262-271.
- [10] **Juan JC, Kartika DA, Wu TY, Hin TYY.** Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: an overview. *Bioresour Technol*; 102 (2011) 452–460.
- [11] **Demirbas A.** Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Appl. Energy*; 86 (2009) 108–117.
- [12] **Oh PP, Lau HLN, Chen J, Chong MF, Choo YM.** A review on conventional technologies and emerging process intensification (PI) methods for biodiesel production. *Renew Sust Energy Rev*; 16 (2012) 5131–5145.
- [13] **Luque R, Herrero-Davila L, Campelo JM, Clark JH, Hidalgo JM, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** Biofuels: a technological perspectiva. *Energy Environ Sci*; 1 (2008) 513-596.

- [14] **Verziu M, Coman SM, Richards R, Parvulescu V.** Transesterification of vegetable oils over CaO catalyts. *Catal Today*; 167 (2011) 64–70.
- [15] **Soriano Jr NU, Venditti R, Argyropoulos DS.** Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. *Fuel*; 88 (2009) 560–565.
- [16] **Guan G, Kusakabe K, Sakurai N, Moriyama K.** Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalyts in the presence of dimethyl ether. *Fuel*; 88 (2009) 81-86.
- [17] **Aransiola EF, Daramola MO, Ojumu TV, Solomon BO, Layokun SK.** Homogeneously Catalyzed Transesterification of Nigerian *Jatropha curcas* Oil into Biodiesel: A Kinetic Study. *Modern Res Catal*; 2 (2013) 83-89.
- [18] **Macario A, Verri F, Diaz U, Corma A, Giordano G.** Pure silica nanoparticles for liposome/lipase system encapsulation: Application in biodiesel production. *Catal Today*; 204 (2013) 148–155.
- [19] **Macario A, Giordano G.** Catalytic conversion of renewable source for biodiesel production: A comparison between biocatalyts and inorganic catalyts. *Catal. Lett*; 143 (2013) 159–168.
- [20] **Luque R, Clark JH.** Biodiesel-Like Biofuels from Simultaneous Transesterification /Esterification of Waste Oils with a Biomass-Derived Solid Acid Catalyst. *Chem Cat Chem*; 3 (2011) 594-597.
- [21] **Singh Chouhan AP, Sarma AK.** Modern heterogeneous catalyts for biodiesel production: A comprehensive review. *Renew Sust Energy Rev*; 15 (2011) 4378– 4399.
- [22] **Viola E, Blasi A, Valerio V, Guidi I, Zimbardi F, Braccio G, Giordano G.** Biodiesel from fried vegetable oils via transesterification by heterogeneous catalyts. *Catal Today*; 179 (2012) 185– 190.
- [23] **Patil P, Deng S, Rhodes JI, Lammers PJ.** Conversion of waste cooking oil to biodiesel using ferric sulphate and supercritical methanol processes. *Fuel*; 89 (2010) 360–364.
- [24] **Anitescu G, Bruno TJ.** Fluid properties needed in supercritical transesterification of triglyceride feedstocks to biodiesel fuels for efficient and clean combustion – A review. *The Journal of Supercritical Fluids*; 63 (2012) 133–149.
- [25] **Quesada-Medina J, Olivares-Carrillo P.** Evidence of thermal decomposition of fatty acid methyl esters during the synthesis of biodiesel with supercritical methanol. *The Journal of Supercritical Fluids*; 56 (2011) 56–63.

- [26] **Demirbas A.** Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Prog Energy Combustion Sci*; 31 (2005) 466-487.
- [27] **Chen YH, Huang YH, Lin RH, Shang NC.** A continuous-flow biodiesel production process using a rotating packed bed. *Bioresour. Technol*; 101 (2010) 668-673.
- [28] **Serio MD, Tesser R, Pengmei L, Santacesaria E.** Heterogeneous catalysts for biodiesel production. *Energy Fuels*; 22 (2008) 207-217.
- [29] **Vicente G, Martinez M, Aracil J.** Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour Technol* 2004; 92: 297-305.
- [30] **Liu X, He H, Wang Y, Zhu S, Piao X.** Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst. *Fuel*; 87 (2008) 216-221.
- [31] **Guan G, Kusakabe K, Moriyama K, Sakurai N.** Transesterification of sunflower oil with methanol in a microreactor. *Ind Eng Chem Res*; 48 (2009) 1357-1363.
- [32] **Guan G, Teshima M, Sato C, Son SM, Irfan MF, Kusakabe K, Ikeda N, Lin TJ.** Two-phase flow behavior in microtube reactors during biodiesel production from waste cooking oil. *AIChE J.*; 56 (2010) 1383-1390.
- [33] **Behzadi S, Farid MM.** Production of biodiesel using a continuous gas-liquid reactor, *Bioresour Technol*; 100 (2009) 683-689.
- [34] **Son SM, Usakabe K.** Transesterification of sunflower oil in a countercurrent trickle-bed reactor packed with a CaO catalyst. *Chem Eng Proc*; 50 (2011) 650-654.
- [35] **Meng YL, Tian SJ, Li SF, Wang BY, Zhang MH.** Transesterification of rapeseed oil for biodiesel production in trickle-bed reactors packed with heterogeneous Ca/Al composite oxide-based alkaline catalyst. *Bioresour Technol*; 136 (2013) 730-734.
- [36] **Saleh J, Dubé MA., Tremblay AY.** Separation of glycerol from FAME using ceramic membranes. *Fuel Proc Technol*; 82 (2011) 1305-1310.
- [37] **Atadashi IM, Aroua MK, Abdul Aziz AR, Sulaiman NMN.** The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. *Renew Sust Energy Rev*; 16 (2012) 3456-3470.
- [38] **Hasheminejad M, Tabatabaei M, Mansourpanah Y, Khatami far M, Javani A.** Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production. *Bioresource Technology*; 102 (2011) 461-468.
- [39] **Leoneti AB, Aragão-Leoneti V, Oliveira SVWB.** Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renew Energy*; 45 (2012) 138-145.

- [40] **Rahmat N, Abdullah AZ, Mohamed AR.** Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renew Sust Energy Rev*; 14 (2010) 987–1000.
- [41] **Johnson DT, Taconi KA.** The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*; 26 (2007) 338–348.
- [42] **Jayed MH, Masjuki HH, Kalam MA, Mahlia TMI, Husnawan M, Liaquat AM.** Prospects of dedicated biodiesel engine vehicles in Malaysia and Indonesia. *Renew Sust Energy Rev*; 15 (2011) 220–235.
- [43] **Katryniok B, Paul S, Bellière-Baca V, Rey P, Dumeignil F.** Glycerol dehydration to acrolein in the context of new uses of glycerol. *Green Chem*; 12 (2010) 2079-2098.
- [44] **Atadashi IM, Aroua MK, Abdul Aziz A.** High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew Sust Energy Rev*; 14 (2010) 1999-2008.
- [45] **Jaichandar S, Annamalai K.** the status of biodiesel as an alternative fuel for diesel engine – an overview. *J Sust Energy Environ*; 2 (2011) 71-75.
- [46] **Mota CJA, da Silva CXA, Rosenbach N, Costa J, da Silva F.** Glycerin derivatives as fuel additives: The addition of glycerol/acetone ketal (solketal) in gasolines. *Energy Fuels*; 24 (2010) 2733–2736.
- [47] **Stelmachowski M.** Utilization of glycerol, a by-product of the transesterification process of vegetable oils: a review. *Ecological Chem Eng S*; 18 (2011) 9-30.
- [48] **Zheng Y, Chen X, Shen Y.** Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. *Chem. Rev*; 108 (2008) 5253-5277.
- [49] **Ulgen A, Hoelderich W.** Conversion of glycerol to acrolein in the presence of WO₃/ZrO₂. *Catal. Lett.*; 131 (2009) 122-128.
- [50] **Guo X, Li Y, Shi R, Liu Q, Zhan E, Shen W.** Co/MgO catalysts for hydrogenolysis of glycerol to 1, 2-propanediol. *Appl. Catal A: Gen*; 371 (2009) 108-113.
- [51] **Luo ZH, You XZ, Li HR.** Direct preparation kinetics of 1,3-dichloro-2-propanol from glycerol using acetic acid catalyst. *Ind. Eng. Chem. Res.*; 48 (2009) 446-452.
- [52] **Santacesaria E, Tesser R, Di Serio M, Casale L, Verd D.** New process for producing epichlorohydrin via glycerol chlorination. *Ind. Eng. Chem. Res.*; 49 (2010) 964-970.
- [53] **Frusteri F, Arena F, Bonura G, Cannilla C, Spadaro L, Di Blasi O.** Catalytic etherification of glycerol by tert-butyl alcohol to produce oxygenated additives for diesel fuel. *Appl. Catal A: Gen*; 367 (2009) 77-83.

- [54] **Sakthivel A, Nakamura R, Komura K, Sugi Y.** Esterification of glycerol by lauric acid over aluminium and zirconium containing mesoporous molecular sieves in supercritical carbon dioxide medium. *J. Supercritical Fluids*; 42 (2007) 219-225.
- [55] **Akiyama M, Sato S, Takahashi R, Inui K, Yokota M.** Dehydration-hydrogenation of glycerol into 1,2-propanediol at ambient hydrogen pressure. *Appl. Catal A: Gen*; 371 (2009) 60-66.
- [56] **Liang D, Gao J, Wang J, Chen P, Hou Z, Zheng X.** Selective oxidation of glycerol in a base-free aqueous solution over different sized Pt catalysts. *Catal Commun*; 10 (2009) 1586-1590.
- [57] **Prati L, Spontoni P, Gaiassi A.** From renewable to fine chemicals through selective oxidation: the case of glycerol. *Topics Catal*; 52 (2009) 288-296.
- [58] **Zope BN, Davis RJ.** Influence of reactor configuration on the selective oxidation of glycerol over Au/TiO₂. *Top Catal*; 52 (2009) 269-277.
- [59] **Fernandez Y, Arenillas A, Diez MA, Pis JJ, Menendez JA.** Pyrolysis of glycerol over activated carbons for syngas production. *J Anal Appl Pyrolysis*; 84 (2009) 145-150.
- [60] **Adhikari S, Fernando SD, To FSD, Brick MR, Steel PH, Haryanto A.** Conversion of glycerol to hydrogen via a steam reforming process over nickel catalysts. *Energy & Fuels*; 22 (2008) 1220-1226.
- [61] **Adhikari S, Fernando S, Haryanto A.** Hydrogen production from glycerol: An update. *Energy Convers Manage*; 50 (2009) 2600-2604.
- [62] **Kunkes EL, Soares RR, Simonetti DA, and Dumesic JA.** An integrated catalytic approach for the production of hydrogen by glycerol reforming coupled with water-gas shift. *Appl. Catal. B: Environ*; 90 (2009) 693-698.
- [63] **Gombac V, Sordelli L, Montini T, Delgado JJ, Adamski A, Adami G, Cargnello M, Bernal S, Fornasiero P.** CuO_x-TiO₂ photocatalysts for H₂ production from ethanol and glycerol solutions. *J Phys Chem A*; 114 (2010) 3916-3925.
- [64] **Siles-López JA, Martín-Santos AM., Chica-Pérez AF, Martín-Martín A.** Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresour. Technol*; 100 (2009) 5609-5615.
- [65] **Mantzouridou F, Naziri E, Tsimidou MZ.** Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*. *J Agric Food Chem*; 56 (2008) 2668-2675.

- [66] **Celik E, Ozbay N, Oktar N, Cüalıklar P.** Use of biodiesel by-product crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind Eng Chem Res*; 47 (2008) 2985-2990.
- [67] **Athalye SK, Garcia RA, Wen Z.** Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*. *J Agric Food Chem*; 57 (2009) 2739-2744.
- [68] **Herszcki Z, Kazmi A, Clark JH, Luna D.** Secondary processing of plant oil (chapter 4). In Kazmi A, Clark JJ, Kraus GA, editors. *Advanced oil crop biorefineries* :RSC Green Chemistry Series n° 14. London (2012); 166-202.
- [69] **Hajek M, Skopal F.** Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresour Technol*; 101 (2010) 3242–3245.
- [70] **Suppes GJ.** Glycerol technology options for biodiesel industry. In: Knothe G, Krahl J, Van Gerpen J, editors. *The Biodiesel Handbook*. Urbana: AOCS Press; (2010); 439–455.
- [71] **Knothe G.** Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progr Energy Combustion Sci*; 36 (2010) 364–373.
- [72] **Chang CC, Wan SW.** China's motor fuels from tung oil. *Ind Eng Chem*; 39 (1947) 1543–1548.
- [73] **Arvidsson R, Persson S, Fröling M, Svanström M.** Life cycle assessment of hydrotreated vegetable oil from rape, oil palm and *Jatropha*. *J Cleaner Prod*; 19 (2011) 129–137.
- [74] **Lapuerta M, Villajos M, Agudelo JM, Boehman AL.** Key properties and blending strategies of hydrotreated vegetable oil as biofuel for diesel engines. *Fuel Proc Technol*; 92 (2011) 2406–2411.
- [75] **Veriansyah B, Han JY, Kim SK, Hong SA, Kim YJ, Lim JS, Shu YW, Oh SG, Kim J.** Production of renewable diesel by hydroprocessing of soybean oil: Effect of catalysts. *Fuel*; 94 (2012) 578–585.
- [76] **Sotelo-Boyás R, Liu Y, Minowa T.** Renewable Diesel Production from the Hydrotreating of Rapeseed Oil with Pt/Zeolite and NiMo/Al₂O₃ Catalysts. *Ind. Eng. Chem. Res.*; 50 (2011) 2791–2799.
- [77] **Liu Y, Sotelo-Boyás R, Murata K, Minowa T, Sakanishi K.** Hydrotreatment of Vegetable Oils to Produce Bio-Hydrogenated Diesel and Liquefied Petroleum Gas Fuel over Catalysts Containing Sulfided Ni–Mo and Solid Acids. *Energy Fuels*; 25 (2011) 4675-4685.

- [78] **Templis Ch, Vonortas A, Sebos I, Papayannakos N.** Vegetable oil effect on gasoil HDS in their catalytic co-hydroprocessing. *Appl Catal B: Environ*; 104 (2011) 324–329.
- [79] **Shi N, Liu Q, Jiang T, Wang T, Ma Li, Zhang Q, Zhang X.** Hydrodeoxygenation of vegetable oils to liquid alkane fuels over Ni/HZSM-5 catalysts: Methyl hexadecanoate as the model compound. *Catal Commun*; 20 (2012) 80–84.
- [80] **Wang C, Tian Z, Wang L, Xu R, Liu Q, Ma H, Wang BB.** One-Step Hydrotreatment of Vegetable Oil to Produce High Quality Diesel-Range Alkanes. *Chem Sus Chem*; 5 (2012) 1974–1983.
- [81] **Sivasamy A, Cheah KY, Fornasiero P, Kemausuor F, Zinoviev S, Miertus S.** Catalytic Applications in the Production of Biodiesel from Vegetable Oils. *Chem Sus Chem*; 2 (2009) 278 – 300.
- [82] **Tiwari R, Rana RS, Kumar R, Verma D, Kumar R, Joshi RK, Garg MO, Sinha AK.** Hydrotreating and hydrocracking catalysts for processing of waste soya-oil and refinery-oil mixtures. *Catal Commun*; 12 (2011) 559–562.
- [83] **Giannakopoulou K, Lukas M, Vasiliev A, Brunner C, Schnitzer H.** Low pressure catalytic co-conversion of biogenic waste (rapeseed cake) and vegetable oil. *Bioresour Technol*; 101 (2010) 3209–3219.
- [84] **Han J, Duan J, Chen P, Lou H, Zheng X, Hong H.** Carbon-Supported Molybdenum Carbide Catalysts for the Conversion of Vegetable Oils. *Chem Sus Chem*; 5 (2012) 727–733.
- [85] **Serrano-Ruiz JC, Ramos-Fernández EV, Sepúlveda-Escribano A.** From biodiesel and bioethanol to liquid hydrocarbon fuels: new hydrotreating and advanced microbial technologies. *Energy Environ Sci*; 5 (2012) 5638-5652.
- [86] **Gong S, Shinozaki A, Shi M, Qian EW.** Hydrotreating of Jatropha Oil over Alumina Based Catalysts. *Energy Fuels*; 26 (2012) 2394–2399.
- [87] **Toba M, Abe Y, Kuramochi H, Osako M, Mochizuki T, Yoshimura Y.** Hydrodeoxygenation of waste vegetable oil over sulfide catalysts. *Catal Today*; 164 (2011) 533–537.
- [88] **Šimáček P, Kubička D, Kubičková I, Homola F, Pospíšil M, Chudoba J.** Premium quality renewable diesel fuel by hydroprocessing of sunflower oil. *Fuel*; 90 (2011) 2473–2479.
- [89] **Bezergianni S, Kalogianni A, Dimitriadis A.** Catalyst evaluation for waste cooking oil hydroprocessing. *Fuel*; 93 (2012) 638–641.

- [90] **Peng B, Yuan X, Zhao C, Lercher JA.** Stabilizing Catalytic Pathways via Redundancy: Selective Reduction of Microalgae Oil to Alkanes. *J Am Chem*; 134 (2012) 9400–9405.
- [91] **Liu J, Liu C, Zhou G, Shen S, Rong L.** Hydrotreatment of Jatropha oil over NiMoLa/Al₂O₃ catalyst. *Green Chem*; 14 (2012) 2499-2505.
- [92] **Donnis B, Egeberg RG, Blom P, Knudsen KG.** Hydroprocessing of Bio-Oils and Oxygenates to Hydrocarbons. Understanding the Reaction Routes. *Top Catal*; 52 (2009) 229–240.
- [93] **Huber, GW, O'Connor P, Corma A.** Processing biomass in conventional oil refineries: Production of high quality diesel by hydrotreating vegetable oils in heavy vacuum oil mixtures. *Appl. Catal. A Gen*; 329 (2007) 120-129.
- [94] **Mercader FM, Groeneveld MJ, Kersten SRA, Way NWJ, Schaverien, CJ, Hogendoorn JA.** Production of advanced biofuels: Co-processing of upgraded pyrolysis oil in standard refinery units. *Appl. Catal. B Environ*; 96 (2010) 57–66.
- [95] **Corma A, Huber GW, Sauvanaud L, O'Connor P.** Processing biomass-derived oxygenates in the oil refinery: Catalytic cracking (FCC) reaction pathways and role of catalyst. *J. Catal*: 247 (2007) 307-327.
- [96] **Corma A, Renz M, Schaverien, C.** Coupling Fatty acids by Ketonic Decarboxylation Using Solid Catalysts for the Direct Production of Diesel, Lubricants and Chemicals. *Chem Sus Chem*; 1 (2008) 739 – 741.
- [97] **Lappas AA, Bezergianni S, Vasalos IA.** Production of biofuels via co-processing in conventional refining processes. *Catal Today*; 145 (2009) 55–62.
- [98] **Melero JA, Clavero MA, Calleja G, García A, Miravalles R, Galindo T.** Production of Biofuels via the Catalytic Cracking of Mixtures of Crude Vegetable Oils and Nonedible Animal Fats with Vacuum Gas Oil. *Energy Fuels*; 24 (2010) 707–717.
- [99] **Fogassy G, Thegarid N, Toussaint G., van Veen AC, Schuurman Y, Mirodatos C.** Biomass derived feedstock co-processing with vacuum gas oil for second-generation fuel production in FCC units. *Appl Catal B: Environ*; 96 (2010) 476–485.
- [100] **Tóth C, Baladincz P, Kovács S, Hancsók J.** Producing clean diesel fuel by co-hydrogenation of vegetable oil with gas oil. *Clean Technol Environ Policy*; 13 (2011) 581-585.
- [101] **Wan L, Zhang SP, Li QY, Xu QL, Yan YJ.** Co-processing the High-boiling Fraction of Bio-oil with Paraffin Oil. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*; 35 (2013) 717-724.

- [102] **Rana BS, Kumar R, Tiwari R, Kumar R, Joshi RK, Garg MO, Sinha AK.** Transportation fuels from co-processing of waste vegetable oil and gas oil mixtures. *Biomass Bioenergy*; 56 (2013) 43–52.
- [103] **Hancsók J, Krár M, Kasza T, Kovács S, Tóth C, Varga Z.** Investigation of Hydrotreating of Vegetable Oil-Gas Oil Mixtures. *J Environ Sci Engineering*; 5 (2011) 500-507.
- [104] **Chen S.** Green Oil Production by Hydroprocessing. *Intern J Clean Coal Energy*; 1 (2012) 43-55.
- [105] **Jha MK, Sinha AK, Agnihotri P.** Hydroprocessing of Jatropha oil to produce Green Fuels. *Intern J Chem Tech Research*; 5 (2013) 765-770.
- [106] **Bezergianni S, Dimitriadis A.** Comparison between different types of renewable diesel. *Renew Sust Energy Rev*; 21 (2013) 110–116.
- [107] **Satyarthi JK, Chiranjeevi T, Gokak DT, Viswanathan PS.** An overview of catalytic conversion of vegetable oils/fats into middle distillates. *Catal Sci Technol*; 3 (2013) 70-80.
- [108] **Naika SN, Goudb VV, Rout PK, Dalai AK.** Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew Sust Energy Rev*; 14 (2010) 578–597.
- [109] **Melero JA, Iglesias J, Garcia A.** Biomass as renewable feedstock in standard refinery units. Feasibility, opportunities and challenges. *Energy Environ Sci*; 5 (2012) 7393-7420.
- [110] **No SY.** Application of hydrotreated vegetable oil from triglyceride based biomass to CI engines – A review. *Fuel*; 115 (2014) 88–96.
- [111] **Arbogast S, Bellman D, Paynter JD, Wykowski J.** Advanced bio-fuels from pyrolysis oil: The impact of economies of scale and use of existing logistic and processing capabilities. *Fuel Process Technol*; 104 (2012) 121–127.
- [112] **Melero JA, Vicente G, Morales G, Paniagua M, Bustamante J.** Oxygenated compounds derived from glycerol for biodiesel formulation: Influence on EN 14214 quality parameters. *Fuel*; 89 (2010) 2011–2018.
- [113] **Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W.** The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *Eur J. Lipid Sci Technol*; 111 (2009) 808–813.
- [114] **Vasudevan PT, Briggs M.** Biodiesel production—Current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 35 (2008) 421–430.
- [115] **Ganesan D, Rajendran A, Thangavelu V.** An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. *Rev Environ Sci Biotechnol*; 8 (2009) 367–394.

- [116] **Kijenski J, Lipkowski A, Walisiewicz-Niedbalska W, Gwardiak H, Roz'yczki K, Pawlak I.** A biofuel for compression-ignition engines and a method for preparing the biofuel. European Patent EP1580255; (2004).
- [117] **Kijenski J, Rozycki K, Lipkowski AW, Walisiewicz-Niedbalska W.** New ester biofuel Gliperol (R). *Przemysl Chem*; 86 (2007) 269-272.
- [118] **Kijenski J.** Biorefineries: from biofuels to the chemicalization of agricultural products. *Polish J Chem Technol*; 9 (2007) 42-45.
- [119] **Demirbas A.** Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Convers Manage*; 49 (2008) 125-130.
- [120] **Xu Y, Du W, Liu D, Zeng J.** A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnol Lett*; 25 (2003) 1573-1576.
- [121] **Xu Y, Du W, Liu D.** Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J Mol Catal B Enzym*; 32 (2005) 241-245.
- [122] **Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J.** Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J Mol Catal B Enzym*; 30 (2004) 125-129.
- [123] **Orçaire O, Buisson P, Pierre AC.** Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzym*; 42 (2006) 106-113.
- [124] **Usai EM, Gualdi E, Solinas V, Battistel E.** Simultaneous enzymatic synthesis of FAME and triacetyl glycerol from triglycerides and methyl acetate. *Bioresour Technol*; 101 (2010) 7707-7712.
- [125] **Huang Y, Yan Y.** Lipase-Catalyzed Biodiesel Production with Methyl Acetate as Acyl Acceptor. *Zeitschrift für Naturforschung*; 63 (2008) 297-302.
- [126] **Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z.** Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresour Technol*; 100 (2009) 5146-5154.
- [127] **Talukder MMR, Das P, Fang TS, Wu JC.** Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. *Biochem Engineer J*; 55 (2011) 119-122.
- [128] **Vasudevan PT, Fu B.** Environmentally Sustainable Biofuels: Advances in Biodiesel Research. *Waste Biomass Valorization*; 1 (2010) 47-63.
- [129] **Ruzich NI, Bassi A.S.** Investigation of Enzymatic Biodiesel Production using Ionic Liquid as a Co-solvent. *Canadian J Chem Engineering*; 68 (2010) 277-284.

- [130] **Saka S, Isayama Y.** A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. *Fuel*; 88 (2009) 1307–1313.
- [131] **Tan, KT, Lee KT, Mohamed AR.** A glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: An optimization study via Response Surface Methodology. *Bioresour Technol*; 101 (2010) 965–969.
- [132] **Campanelli P, Banchemo M, Manna L.** Synthesis of biodiesel from edible, non-edible and waste cooking oils via supercritical methyl acetate transesterification. *Fuel*; 89 (2010) 3675–3682.
- [133] **Niza NM, Tan K, Ahmad Z, Lee KT.** Comparison and optimisation of biodiesel production from *Jatropha curcas* oil using supercritical methyl acetate and methanol. *Chemical Papers*; 65 (2011) 721-729.
- [134] **Niza NM, Tan KT, Lee KT, Ahmad Z.** Biodiesel production by non-catalytic supercritical methyl acetate: Thermal stability study. *Appl Energy*; 101 (2013) 198–202.
- [135] **Goembira F, Matsuura K, Saka S.** Biodiesel production from rapeseed oil by various supercritical carboxylate esters. *Fuel*; 97 (2012) 373–378.
- [136] **Maddikeri GL, Pandit AB, Gogate PR.** Ultrasound assisted interesterification of waste cooking oil and methyl acetate for biodiesel and triacetin production. *Fuel Process Technol*; 116 (2013) 241–249.
- [137] **Casas A, Ramos MJ, Pérez A.** Product Separation after Chemical Interesterification of Vegetable Oils with Methyl Acetate. Part II: Liquid–Liquid Equilibrium. *Ind Eng Chem Res*; 51 (2012) 10201–10206.
- [138] **Casas A, Ramos MJ, Pérez A.** Kinetics of chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate for biodiesel and triacetin production. *Chem Engineering J*; 171 (2011) 1324–1332.
- [139] **Casas A, Ramos MJ, Perez A.** New trends in biodiesel production: Chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate. *Biomass Bioenergy*; 35 (2011) 1702-1709.
- [140] **Casas A, Ramos MJ, Pérez A.** Methanol-enhanced chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate. *Fuel*; 106 (2013) 869–872.
- [141] **Modi MK, Reddy JRC, Rao B., Prasad RBN.** Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresour Technol*; 98 (2007) 1260–1264.

- [142] **Kim SJ, Jung SM, Park YC, Park K.** Lipase catalyzed transesterification of soybean oil using ethyl acetate, an alternative acyl acceptor. *Biotechnol Bioprocess Engineering*; 12 (2007) 441-445.
- [143] **Jeong GT, Park DH.** Synthesis of Rapeseed Biodiesel Using Short-Chained Alkyl Acetates as Acyl Acceptor. *Appl Biochem Biotechnol*; 161 (2010) 195–208.
- [144] **Gonzalves VLC, Pinto BP, Silva JC, Mota CJA.** Acetylation of glycerol catalyzed by different solid acids. *Catal Today*; 131 (2008) 673–677.
- [145] **Liao X, Zhua Y, Wang SG, Li Y.** Producing triacetyl glycerol with glycerol by two steps: Esterification and acetylation. *Fuel Process Technol*; 90 (2009) 988–993.
- [146] **Balaraju M, Nikhitha P, Jagadeeswaraiiah K, Srilatha K, Sai Prasad PS, Lingaiah N.** Acetylation of glycerol to synthesize bioadditives over niobic acid supported tungstophosphoric acid catalysts. *Fuel Process Technol*; 91 (2010) 249–253.
- [147] **Rezayat M, Ghaziaskar HS.** Continuous synthesis of glycerol acetates in supercritical carbon dioxide using Amberlyst 15®. *Green Chem*; 11 (2009) 710-715.
- [148] **Galana MI, Bonet J, Sire R, Reneaume JM, Plesu AE.** From residual to useful oil: Revalorization of glycerine from the biodiesel synthesis. *Bioresour Technol*; 100 (2009) 3775–3778.
- [149] **Bonet J, Costa J, Sire R, Reneaume JM, Plesu AE, Plesu V, Bozga G.** Revalorization of glycerol: Comestible oil from biodiesel synthesis. *Food bioprod process*; 87 (2009) 171–178.
- [150] **Ferreira P, Fonseca IM, Ramos AM, Vital J, Castanheiro JE.** Acetylation of glycerol over heteropolyacids supported on activated carbon. *Catal Commun*; 12 (2011) 573–576.
- [151] **Casas A, Ruiz JR, Ramos MJ, Perez A.** Effects of triacetin on biodiesel quality. *Energy Fuels*; 24 (2010) 4481–4489.
- [152] **Rao PV, Rao BVA.** Performance, Emission and Cylinder Vibration studies of DI-Diesel Engine with COME-Triacetin Additive Blends. *Intern J Thermal Technol*; 1 (2011) 100-109.
- [153] **Rao PV, Rao BVA, Radhakrishna D.** Experimental Analysis of DI Diesel Engine Performance with Triacetin Blend Fuels of Oxygenated Additive and COME Biodiesel. *Iranica J Energy Environ*; 3 (2012) 109-117.
- [154] **Li Y, Zhao X, Wang Y.** Synthesis of dimethyl carbonate from methanol, propylene oxide and carbon dioxide over KOH/4A molecular sieve catalyst. *Appl Catal A*; 279 (2005) 205–208.

- [155] **Fabrizi D, Bevoni V, Notari M, Rivetti F.** Properties of a potential biofuel obtained from soybean oil by transesterification with dimethyl carbonate. *Fuel*; 86 (2007) 690-697.
- [156] **Notari M, Rivetti F.** Use of a mixture of esters of fatty acids as fuel or solvent. Patent No. WO2004/052874 to Polimeri Europa; (2004).
- [157] **Islam MR, Kurle YM, Gossage JL, Benson TJ.** Kinetics of Triazabicyclodecene-Catalyzed Canola Oil Conversion to Glycerol-free Biofuel Using Dimethyl Carbonate. *Energy Fuels*; 27 (2013) 1564–1569.
- [158] **Kurle YM, Islam MR, Benson TJ.** Process development and simulation of glycerol-free biofuel from canola oil and dimethyl carbonate. *Fuel Process Technol*; 114 (2013) 49–57.
- [159] **Zhang L, Sheng B, Xin Z, Liu Q, Sun S.** Kinetics of transesterification of palm oil and dimethyl carbonate for biodiesel production at the catalysis of homogeneous base catalyst. *Bioresour Technol*; 101 (2010) 8144–8150.
- [160] **Panchal BM, Dhoot SB, Deshmukh SA, Sharma MR, Kachole MS.** Production of DMC-BioD from Pongamia pinnata seed oil using dimethyl carbonate. *Fuel*; 109 (2013) 201–205.
- [161] **Ilham Z, Saka S.** Dimethyl carbonate as potential reactant in non-catalytic biodiesel production by supercritical method. *Bioresour Technol*; 100 (2009) 1793–1796.
- [162] **Ilham Z, Saka S.** Production of biodiesel with glycerol carbonate by non-catalytic supercritical dimethyl carbonate. *Lipid Technol*; 23 (2011) 10-13.
- [163] **Tan KT, Lee KT.** A review on supercritical fluids (SCF) technology in sustainable biodiesel production: Potential and challenges. *Renew Sust Energy Rev*; 15 (2011) 2452–2456.
- [164] **Ilham Z, Saka S.** Optimization of supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production. *Fuel*; 97 (2012) 670–677.
- [165] **Ilham Z, Saka S.** Two-step supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production from Jatropha curcas oil. *Bioresour Technol*; 101 (2010) 2735–2740.
- [166] **Su E, You P, Wei D.** In situ lipase-catalyzed reactive extraction of oilseeds with short-chained dialkyl carbonates for biodiesel production. *Bioresour Technol*; 100 (2009) 5813–5817.
- [167] **Zhang L, Sun S, Xin Z, Sheng B, Liu Q.** Synthesis and component confirmation of biodiesel from palm oil and dimethyl carbonate catalyzed by immobilized-lipase in solvent-free system. *Fuel*; 89 (2010) 3960–3965.
- [168] **Min JY, Lee EY.** Lipase-catalyzed simultaneous biosynthesis of biodiesel and glycerol carbonate from corn oil in dimethyl carbonate. *Biotechnol Lett*; 33 (2011) 1789–1796.

- [169] **Sun S, Zhang L, Meng X, Xin Z.** Kinetic study on lipase catalyzed trans-esterification of palm oil and dimethyl carbonate for biodiesel production. *J Renew Sust Energy*; 5 (2013) 033127.
- [170] **Wang Y, Cao X.** Enzymatic synthesis of fatty acid ethyl esters by utilizing camellia oil soapstocks and diethyl carbonate. *Bioresour Technol*; 102 (2011) 10173–10179.
- [171] **Su E, Du L, Gong X, Wang P.** Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of *Jatropha Curcas* L. Seed Oil to Fatty Acid Esters: An Optimization Study. *J Am Oil Chem Soc*; 88 (2011) 793–800.
- [172] **Awang R, May CY.** Enzymatic Synthesis of Palm Alkyl Ester Using Dialkyl Carbonate as an Alkyl Donors. *Am J Appl Sci*; 7 (2010) 1083-1086.
- [173] **Zhang KP, Lai JQ, Huang ZL, Yang Z.** *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresour Technol*; 102 (2011) 2767–2772.
- [174] **Su EZ, Zhang MJ, Zhang JG, Gao JF, Wei DZ.** Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor. *Biochem Eng J*; 36 (2007) 167-173.
- [175] **Ansari FT, Choube A.** Impact of Biofuel in Petrol Engine-A Review. *Intern J Thermal Technol*; 2 (2012) 171-175.
- [176] **Rounce P, Tsolakis A, Leung P, York APE.** A Comparison of Diesel and Biodiesel Emissions Using Dimethyl Carbonate as an Oxygenated Additive. *Energy Fuels*; 24 (2010) 4812–4819.
- [177] **Li J, Wang T.** Coupling reaction and azeotropic distillation for the synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. *Chem Engineering Process*; 49 (2010) 530–535.
- [178] **Ochoa-Gómez JR, Gómez-Jiménez-Aberasturi O, Maestro-Madurga B., Pesquera-Rodríguez A, Ramírez-López C, Lorenzo-Ibarreta L, Torrecilla-Soria J, Villarán-Velasco MC.** Synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate by transesterification: Catalyst screening and reaction optimization. *Appl Catal A: Gen*; 366 (2009) 315–324.
- [179] **Jaeger-Voirol A, Durand I, Hillion G, Delfort B, Montagne X.** Glycerin for New Biodiesel Formulation. *Oil Gas Sci and Technol – Rev. IFP*, (2008); 63: 395-404.
- [180] **Pagliari M, Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., Pina C.D.** From Glycerol to Value-Added Products *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46 (2007) 4434–4440.
- [181] **Caballero V, Bautista F.M, Campelo JM, Luna D, Marinas JM., Romero AA, Hidalgo JM, Luque R, Macario A, Giordano G.** Sustainable preparation of a novel glycerol-free

- biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochem*; 44 (2009) 334-342.
- [182] **Verdugo C, Luque R, Luna D, Hidalgo JM, Posadillo A, Sancho E, Rodríguez S, Ferreira-Días S, Bautista FM, Romero AA.** A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresour. Technol.*; 101 (2010) 6657-6662.
- [183] **Verdugo C, Luna D, Posadillo A, Sancho ED, Rodríguez S, Bautista FM, Luque R, Marinas JM, Romero AA.** Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catal Today*; 167 (2011) 107–112.
- [184] **Luna D, Posadillo A, Caballero V, Verdugo C, Bautista FM, Romero AA, Sancho ED, Luna C, Calero J.** New Biofuel Integrating Glycerol into Its Composition Through the Use of Covalent Immobilized Pig Pancreatic Lipase. *Inter J Mol Sci*; 13 (2012) 10091-10112.
- [185] **Luna D, Bautista FM, Caballero V, Campelo JM, Marinas JM., Romero AA.** Method for producing biodiesel using porcine pancreatic lipase as an enzymatic catalyst. European Patent EP 2 050 823 A1; (2009).
- [186] **Luna C, Sancho ED, Luna D, Caballero V, Calero J, Posadillo A, Verdugo C, Bautista FM, Romero AA.** Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on AlPO₄ Support. *Energies*; 6 (2013) 3879-3900.
- [187] **Wadumesthrige K, Ara M, Salley SO, Ng KYS.** Investigation of lubricity characteristics of biodiesel in petroleum and synthetic fuel. *Energy Fuels*; 23 (2009) 2229–2234.
- [188] **Xu Y, Wnag Q, Hu X, Li C, Zhu X.** Characterization of the lubricity of bio-oil/diesel fuel blends by high frequency reciprocating test rig. *Energy*; 35 (2010) 283–287.
- [189] **Haseeb ASMA, Sia SY, Fazal MA., Masjuki HH.** Effect of temperature on tribological properties of palm biodiesel. *Energy*; 35 (2010) 1460–1464.
- [190] **Çelikten I.** The Effect of Biodiesel, Ethanol and Diesel Fuel Blends on The Performance and Exhaust Emissions in A DI Diesel Engine. *Gazi. Univ. J. Sci.*; 24 (2011) 341-346.
- [191] **Cheenkachorn K, Fungtammasan B.** Biodiesel as an additive for diesohol. *Intern. J. Green Energ.*; 6 (2009) 57–72.
- [192] **Jaganjac M, Prah IO, Cipak A, Cindric M, Mrakovcic L, Tatzber F, Ilincic P, Rukavina V, Spehar B, Vukovic JP, Telen S, Uchida K, Lulic Z, Zarkovic N.** Effects

- of bioreactive acrolein from automotive exhaust gases on human cells *in vitro*. *Environ. Toxicol.*; 27 (2011) 644-652.
- [193] **Pang X, Mu Y, Yuan J, He H.** Carbonyl emission from ethanol-blended gasoline and biodiesel-ethanol-diesel used in engines. *Atmospheric Environm.*; 42 (2008) 1349-1358.
- [194] **Bhale PV, Deshpande NV, Thombre SB.** Improving the low temperature properties of biodiesel fuel. *Renew Energy*; 34 (2009) 794-800.
- [195] **Lapuerta M, García-Contreras R, Agudelo JR.** Lubricity of Ethanol-Biodiesel Diesel Fuel Blends. *Energy Fuels*; 24 (2010) 1374-1379.
- [196] **Ribeiro NM, Pinto AC, Quintella CM, Rocha GO, Teixeira LSG, Guarieiro LLN, Rangel MC, Veloso MCC, Rezende MJC, Cruz RS, Oliveira A.M, Torres EA, Andrade JB.** The Role of Additives for Diesel and Diesel Blended (Ethanol or Biodiesel) Fuels: A Review. *Energy Fuels*; 21 (2007) 2433-2445.
- [197] **Dunn RO.** Effects of Monoacylglycerols on the Cold Flow Properties of Biodiesel. *J Am Oil Chem Soc*; 89 (2012) 1509-1520.
- [198] **Tang H, Salley SO, Ng KYS.** Fuel properties and precipitate formation at low temperature in soy-, cottonseed-, and poultry fat-based biodiesel blends. *Fuel*; 87 (2008) 3006-3017.
- [199] **Tang H, Guzman RD, Ng KYS.** Comparing Process Efficiency in Reducing Steryl Glucosides in Biodiesel. *J Am Oil Chem Soc*; 87 (2010) 337-345.
- [200] **Dunn R.O.** Effects of minor constituents on cold flow properties and performance of biodiesel. *Progress Energy Combustion Sci*; 35 (2009) 481-489.
- [201] **Echim C, Maes J, Greyt WD.** Improvement of cold filter plugging point of biodiesel from alternative feedstocks. *Fuel*; 93 (2012) 642-648.
- [202] **Koshland Jr. DE.** The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33 (1994) 2375-2378.
- [203] **Koshland DE, Neet KE.** The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 37 (1968) 359-411.
- [204] **Tischer W, Wedekind F.** Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Topics in Current Chem.*, 200 (1999) 96-126.
- [205] **Cao L, van Langeny L, Sheldon RA.** Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Op. Biotech.*, 14 (2003) 387-394.
- [206] **Bickerstaff GF.** Immobilization of Enzymes and Cells. *Ed. Humana Press, (Totowa, New Jersey, EEUU) 1997.*

- [207] **Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Krishna SH.** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotech.*, 20 (2002) 433-437.
- [208] **Svendsen A.** Lipase protein engineering (rev). *Biochim. Biophys Acta*, 1543 (2000) 223-238.
- [209] **Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, Otey CR, MacMillan D, Arnold FH.** Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Op. in Struct. Biology*, 15 (2005) 447-452.
- [210] **Ballesteros A, Bornscheuer U, Capewell A, Combes D, Condoret JS, Koenig K, Kolisis FN, Marty A, Menge U, Scheper T, Stamatis H, Xenakis A.** Enzymes in Non-Conventional Phases. *Biocat. Biotransf.*, 13 (1995) 1-42.
- [211] **Haas HJ, Scott KM.** Diesel fuel as a solvent for the lipasecatalyzed alcoholysis of triglycerides and phosphatidylcholine. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 (1996) 1497-1504.
- [212] **Park S, Kazlauskas, RJ.** Biocatalysis in ionic liquids, advantages beyond green technology. *Current Op. Biotech.*, 14 (2003) 432-437.
- [213] **Schomburg I, Chang A, Ebeling C, Gremse M, Heldt C, Huhn G, Schomburg D. Brenda.** The enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.*, 32 (2004) 431-433.
- [214] **Faber, K.** Biotransformations in Organic chemistry. (Faber, K. Ed.) *Spriger-Verlag, Heidelberg. 2004.*
- [215] **Carrea G, Ottolina G, Riva S.** Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media, 16. G. Carrea, G. Ottolina and S. Riva. *Trends Biotech.*, 13 (1995) 63-70.
- [216] **Klibanov AM.** Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.*, 14 (1989) 141-144.
- [217] **Klibanov AM.** Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409 (2001) 241-246.
- [218] **Khmelnitsky YL, and Rich JO.** Biocatalysis in nonaqueous solvents, *Current Op. Chem. Bio.*, 3 (1999) 47-53.
- [219] **Yang Z, Pan W.** Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis, a Review. *Enz. Microb. Tech.*, 37 (2005) 19-28.
- [220] **Zaks A, Klibanov AM.** Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, 224 (1984) 1249-1251.
- [221] **Zale SE, Klibanov AM.** Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry*, 25 (1986) 5432-5444.
- [222] **Ke T, Klibanov AM.** Markedly Enhancing Enzymatic Enantioselectivity in Organic Solvents by Forming Substrate Salts. *J. A. Chem. Soc.*, 121 (1999) 3334-3340.

- [223] **Desai UR, Klibanov AM.** Assessing the Structural Integrity of a Lyophilized Protein in Organic Solvents. *J. A. Chem. Soc.*, 117 (1995) 3940-3945.
- [224] **Al-Zuhair S, Jayaraman KV, Krishnan S, Chan WH.** The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochem. Eng. J.*, 30 (2006) 212-217.
- [225] **Wehtje E, Adlercreutz P.** Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotech. Bioeng.*, 55 (1997) 798-806.
- [226] **Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas VJ.** Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Biotechnology*, 119 (2005) 291-299.
- [227] **Hsu A, Jones K, Foglia TA, Marmer WN.** Immobilized Lipase-Catalysed Production of Alkyl Esters of Restaurant Grease as Biodiesel. *Biotech. Appl. Biochem.*, 36 (2002) 181-186.
- [228] **Zaks A, Klibanov AM.** Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 3192-3196.
- [229] **Zaks A, Klibanov AM.** Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *J. Biologic. Chem.*, 263 (1988) 3194-3201.
- [230] **Roy I, Gupta MN.** Freeze drying of proteins: some emerging concerns. *Biotech. Appl. Biochem.*, 39 (2004) 165-177.
- [231] **Lee MY, Dordick JS.** Enzyme activation for nonaqueous media. *Current. Op. Biotech.*, 13 (2002) 376-384.
- [232] **Margolin AL, Navía MN.** Protein Crystals as Novel Catalytic Materials. *Ang. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2204-2222.
- [233] **Matsushima A, Kodera Y, Hiroto M, Nishimura H, Inada I.** Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2 (1996) 1-17.
- [234] **Bovara R, Carrea G, Gioacchini AM, Riva S, Secundo F.** Activity, Stability, and Conformation of Methoxypoly(Ethylene Glycol)-Subtilisin at Different Concentrations of Water in Dioxane. *Biotech. Bioeng.*, 54 (1997) 50-57.
- [235] **Carrea G, Ottolina G, Riva S.** Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends. Biotech.*, 13 (1995) 63-70.
- [236] **Wingard L.B.** Enzyme Engineering. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Ed. Interscience Publishers, New York. 1972.
- [237] **Brady D, Jordaan AJ.** Advances in enzyme immobilisation. *Biotech. Lett.*, 31 (2009) 1639-1650.

- [238] **Betancor L, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM.** Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enz. Microb. Tech.*, 39 (2006) 877-882.
- [239] **Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T.** "Bioprocess Technology, Vol. 16: Industrial Application of Immobilized Biocatalysts", Marcel Dekker, New York. 1993.
- [240] **Sheldon RA.** Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance *Adv. Synth. Cat.*, 349 (2007) 8-9, 1289-1307.
- [241] **Worsfold PJ.** Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. *Pure Appl. Chem.*, 4 (1995) 597-600.
- [242] **Salis A, Meloni D, Ligas S, Casula M, Monduzzi M, Solinas V, Dumitriu E.** Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. *Langmuir*, 21 (2005) 5511-5516.
- [243] **Reetz MT.** Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Adv. Mater.*, 9 (1997) 943-954.
- [244] **Díaz JF, Balkus Jr KJ.** Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 2 (1996) 115-126.
- [245] **Macario A, Giordano G, Setti L, Parise A, Campelo JM, Marinas JM, Luna D.** Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. *Biocat. Biotrans.*, 25 (2007) 328-335.
- [246] **St Clair NL, Navia MN.** Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *J. A. Chem. Soc.*, 114 (1992) 7314-7317.
- [247] **Persichetti RA, Lalonde J, Govardhan CP, Khalaf NK, Margolin AL.** *Candida rugosa* lipase-enantioselectivity enhancements in organic-solvents. *Tetrahedron Lett.*, 37 (1996) 6507-6510.
- [248] **Le Carre E, Lewis N, Ribas C, Wells A.** Convenient Preparation of Functionalised Polymer-Based Resins via an Economical Preparation of Chloromethylated Polystyrene Resins (Merrifield Type). *Org. Proc. Res. Dev.*, 4 (2000) 606-610.
- [249] **Delair T, Marguet V, Pichot C, Mandrand B.** Synthesis and characterization of cationic amino functionalized polystyrene latexes. *Colloid & Polimer Sci.*, 272 (1994) 962-970.
- [250] **Gao L.** Immobilised enzymes: science or art? *Current Op. Chem. Bio.*, 9 (2005) 217-226.
- [251] **Clark JH, Macquarrie DJ.** Catalysis of liquid phase organic reactions using chemically modified mesoporous inorganic solids. *Chem. Comm.*, (1998) 853-860.

- [252] **Gaspers PB, Robertson CR, Gast AP.** Enzymes on Immobilized Substrate Surfaces: Diffusion. *Langmuir*, 10 (1994) 2699-2704.
- [253] **Zhang X, Guan RF, Wu DQ, Chan KY.** Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 33 (2005) 43-50.
- [254] **Tanriseven A, Dogan S.** A novel method for the immobilization of -galactosidase. *Proc. Biochem.*, 38 (2002) 27-30.
- [255] **Nilsson K, Mosbach K.** Peptide synthesis in aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tresyl chloride-activated agarose. *Biotech. Bioeng.*, 26 (1984) 1146-1154.
- [256] **Narinesingh O, Ngo T.** Papain covalently immobilized on fractogel derivative: preparation, bioreactor flow kinetics, and stability. *Biotech. Appl. Biochem.*, 9 (1987) 450-461.
- [257] **Bodalo-Santoyo A, Gomez-Carrasco JL, Gomez-Gomez E, Bastida-Rodríguez J, Máximo-Martín MF, León-Albert G, Hidalgo-Montesinos AM.** Influence of pore size on covalent immobilization of L-aminoacylase on porous glass supports. *An. Quím. Int Ed.*, 94 (1998) 78-83.
- [258] **Guisan RM, Ceinos JM, Blanco RM.** "Procedimiento de Fabricación de Derivados Insolubilizados de Quimotripsina muy Activos y Altamente Estabilizados". *Patente Española 8902176*, 1989.
- [259] **Blanco RM, Guisan JM, Halling P.** Agarose-chymotrypsin as a catalyst for peptide and amino acid ester synthesis in organic media. *Biotech. Lett.*, 11 (1989) 811-816.
- [260] **Bautista FM, Bravo C, Campelo JM, Garcia A, Luna D, Marinas JM.** Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on amorphous AlPO₄ and other inorganic supports. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 72 (1998) 249-254.
- [261] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Jurado A, Luna D, Marinas JM.** Properties of a glucose oxidase covalently immobilized on amorphous AlPO₄ support. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 11 (2001) 567-577.
- [262] **Bautista FM, Bravo C, Campelo JM, Garcia A, Luna D, Marinas JM.** Covalent immobilization of acid phosphatase on amorphous AlPO₄ support. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 6 (1999) 473-481.
- [263] **Klibanov AM.** Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. *Science*, 219 (1983) 722-727.

- [264] **Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R.** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzym. Microbial Tech.*, 40 (2007) 1451-1463.
- [265] **Klibanov AM, Kaplan NO, Kamen MD.** A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: application to a clostridial hydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 3640-3643.
- [266] **Reslow M, Adlercreutz P, Mattiasson B.** On the importance of the support material for bioorganic synthesis Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. *Eur. J. Biochem.*, 172 (1988) 573-578.
- [267] **Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M.** industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409 (2001) 258-268.
- [268] **Scouten WH, Luong, JHT, Brown R.S.** Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends. Biotech.*, 13 (1995) 178-185.
- [269] **De Man JM.** Principles of Food Chemistry. 3^a Ed, Aspen Publisher. Inc. 1999.
- [270] **Mellor RB, Ronnenberg J, Campbell WH, Diekmann S.** Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature*, 355 (1992) 717-719.
- [271] **Chibata I, Tosa T.** Immobilized microbial cells and their applications. *Trends. Biochem. Sci.*, 5 (1980) 88-90.
- [272] **Bautista FM, Bravo C, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** "Procedimiento de fabricación de productos inorgánicos activados útiles como soportes sólidos para la inmovilización covalente de lipasas y otras enzimas y nuevos productos así obtenidos". Patent Application No. 9601847, 1996.
- [273] **Grillet Y, Llewelyn PL, Tosi-Pellenq N, Rouquerol J.** Adsorption of argon, methane, nitrogen, carbon monoxide and water vapour on sepiolite and AlPO₄-5 as studied by isothermal microcalorimetry. *J. Stud. Sci. Surf. Sci. Catal.*, 80 (1993) 235-242.
- [274] **Ruiz-Hitzky E.** Molecular access to intracrystalline tunnels of sepiolite. *J. Mater. Chem.*, 11 (2001) 86-91.
- [275] **González L, Ibarra L, Rodríguez A, Chamorro CJ.** Preparation of amorphous silica by acid dissolution of sepiolite: kinetic and textural study. *Colloid. Interface Sci.*, 109 (1986) 150-160.
- [276] **Jin S, Qui G, Xiao F, Chang Y, Wan C, Yang M.** Investigation of the structural characterization of mesoporous molecular sieves MCM-41 from sepiolite. *J. Am. Ceram. Soc.*, 90 (2007) 957-61.

- [277] **Cabello JA, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** Knoevenagel condensation in the heterogeneous phase using AlPO₄-Al₂O₃ as a new catalyst *J. Org. Chem.*, 49 (1984) 5195-51-97.
- [278] **Campelo JM, García A, Gutiérrez JM, Luna D, Marinas JM.** Alkali-promoted AlPO₄ catalysts. Acid-base and oxidizingreducing properties. *J. Colloid Interface Sci.*, 95 (1983) 544-550.
- [279] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** The effect of the fluoride ion on the catalytic activity of AlPO₄ in the cyclohexene skeletal isomerisation. *J. Cat.*, 102 (1986) 299-308.
- [280] **Campelo JM, Climent MS, Marinas JM.** Alkali-promoted AlPO₄ catalysts II. cyclohexene skeletal isomerization to 1- and 3-methylcyclopentenes. *React. Ket. Cat. Lett.*, 30 (1986) 165-172.
- [281] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Guardañó R, Luna D, Marinas JM.** AlPO₄-supported nickel catalysts. IX. liquid-phase selective hydrogenation of propargyl alcohols *J. Mol. Cat.*, 125 (1990) 171-186.
- [282] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Guardañó R, Luna D, Marinas JM.** Influence of surface support properties on the liquid-phase hydrogenation of propargyl alcohols on AlPO₄-supported nickel catalysts *J. Mol. Cat.*, 67 (1991) 91-104.
- [283] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Guardañó R, Luna D, Marinas JM.** Liquid-phase selective hydrogenation of 1,4-butyndiol on supported Ni and Ni-Cu catalysts. "Heterogeneous Catálisis and Fine Chemicals" (M. Guisnet et al. Eds) p 269-276; Elsevier. Amsterdam (1991).
- [284] **Granados ML, Poves MDZ, Alonso DM, Mariscal R, Galisteo FC, Moreno-Tost R, Santamaría J, Fierro JLG.** Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide. *Appl Catal B: Environ*; 73 (2007) 317-326.
- [285] **Kawashima A, Matsubara K, Honda K.** Acceleration of catalytic activity of calcium oxide for biodiesel production. *Bioresour Technol*; 100 (2009) 696-700.
- [286] **Liu X, He H, Wang Y, Zhu S, Piao X,** Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst. *Fuel*; 87(2008) 216-221.
- [287] **Di Serio M, Tesser R, Pengmei L, Santacesaria E.** Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. *Energy Fuels*; 22 (2008) 207-217.
- [288] **Hattori H.** Heterogeneous Basic Catalysis; *Chem Rev*; 95 (1995) 537-558.
- [289] **Pines H, Veseley JA, Ipatieff VN.** Studies in the terperne series. XXIV. Sodium-catalyzed double bonds migration and dehydrogenation of d-limonene, l-

- ϕ-phellandrene and of 2,4 (8)- and 3,8 (9)-p-methadiene, *J. Am. Chem. Soc*; 77 (1955) 314.
- [290] **Kokes RJ, Dent AL.** *Advan. Catal*, 22 (1972) 1.
- [291] **Kokes, R. J.,** *Proc. of the 5th International Congress of catalysis Miami Beach*, FL, p. 1 (1972).
- [292] **Hattori H, Yoshii N, Tanabe K;** *Proceedings of the 5th International Congress of catalysis Miami Beach*, FL, p. 233 (1972).
- [293] **Hattori H, Kumai H, Tanaka K, Zhang G, Tanabe K;** *Proc. 8th National Symposium on Catalysis, Sindri, India*, (1987), p. 187.
- [294] **Yamaguchi T;** Recent progress in solid superacid. *Appl Catal*; 64 (1990) 41.
- [295] **Campelo JM, Climent MS, Marinas JM;** *React. Kinet. Catal. Lett*; 47 (1992) 7.
- [296] **Villemin D, Texier-boulet F, Ricard M, Moison H, Foucaud A.** Reactions de Wittig, Wittig-Horner et Knoevenagel par activation anionique avec l'alumine ou le fluorure de potassium depose sur l'alumine, sans solvant, *Tetrahedron Lett*; 41 (1985) 1259-1266.
- [297] **Villemin D, Richard M.** Activation de la liaison C-H faiblement acide par adsorption sur KF-Al₂O₃, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 1059.
- [298] **Suzukamo G, Fukao M, Hibi T, Chikaishi K.** *Acid – Base Catalysis*, Kodansha (Tokio) – VCH (Basel, Cambridge, Nueva York, Weinheim), p. 405 (1989).
- [299] **Ushikubo T, Hattori H, Tanabe K.** *Chem. Lett.* 649 (1984).
- [300] **Cavani F, Trifirò F, Vaccari A.** Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications, *Catal. Today*, 11 (1991) 173-301.
- [301] **Kung HH, Ko EI.** Preparation of oxide catalysts and catalysts support- a review of recent advances, *Chem. Eng. J.*, 64 (1996) 203-214.
- [302] **Dzida M, Prusakiewicz P.** The effect of temperature and pressure on the physicochemical properties of petroleum diesel oil and biodiesel fuel. *Fuel.* 87 (2008) 1941-1948.
- [303] **Predojevic ZJ.** The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel.* 87 (2008) 3522-3528.
- [304] **Canoira L, García Galeán J, Alcántara R, Lapuerta M, García-Contreras R.** Fatty acid methyl esters (FAMES) from castor oil: Production process assessment and synergistic effects in its properties. *Renewable Energy.* 35 (2010) 208-217.
- [305] **Mittelbach M.** Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel. *Bioresour Technol*, 56 (1996) 7-11.

- [306] **Encinar JM, González JF, Rodríguez-Reinares A.** Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. *Fuel Process Technol*, 88 (2007) 513-522.
- [307] **Albuquerque MCG, Machado YL, Torres AEB, Azevedo DCS, Cavalcante Jr CL, Firmiano LR, Parente Jr EJS.** Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. *Renew Ener*, 34 (2009) 857-859.
- [308] **Lang X, Dalai AK, Bakhshi NN, Reaney MJ, Hertz PB.** Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour Technol*, 80 (2001) 53-62.
- [309] **Ma F, Hanna MA.** Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol*, 70 (1999) 1-15.
- [310] **Dias JM, Alvim-Ferraz MCM, Almeida MF.** Comparison of the performance of different homogeneous alkali catalysts during transesterification of waste and virgin oils and evaluation of biodiesel quality. *Fuel*, 87 (2008) 3572-3578.
- [311] **Encinar JM, González JF, Rodríguez-Reinares A.** Biodiesel from Used Frying Oil. Variables Affecting the Yields and Characteristics of the Biodiesel. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 44 (2005) 5491-5499.
- [312] **Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á.** Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol*. 100 (2009) 261-268.
- [313] **Eevera T, Rajendran K, Saradha S.** Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. *Renew Ener*. 34 (2009) 762-765.
- [314] **Knothe G.** Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol*. 86 (2005) 1059-1070.
- [315] **Knothe G.** Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*. 36 (2010) 364-373.
- [316] **Cooney MAA y Emerson.** Thermophilic fungi. *Ed. W.H. Freeman and Co. (San Francisco, EEUU)* 17 (1964).
- [317] **Schipper M.A.** *Studies in Mycology* 17, (1978) 53.
- [318] **Scholer, Muller, Schipper.** Fungi patogenic for humans and animals *Part A.- Biology*. Ed Dexter H.Howard; 42 (1982).
- [319] **Blanco A, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** Alkylation of toluene with methanol over AlPO₄, AlPO₄-Al₂O₃, AlPO₄-TiO₂, and AlPO₄-ZrO₂ catalysts. *J. Cat.*, 137 (1992) 51-68.
- [320] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** Gas-phase measurements of the surface basicity of AlPO₄-TiO₂ and AlPO₄- ZrO₂ catalysts. *React. Kinet. Cat. Lett.*, 47 (1992) 263-270.

- [321] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** AlPO₄-Al₂O₃ catalysts with low alumina content. iii. Surface basicity of catalysts obtained in aqueous ammonia *Cat. Lett.*, 19 (1993) 137-142.
- [322] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Navío JA, Macías M.** Anion treatment (F⁻ or SO₄⁼) of AlPO₄-Al₂O₃ (25 wt.-% Al₂O₃) catalysts. IV. Catalytic performance in the alkylation of phenol with methanol. *Appl. Cat. A.*, 99 (1993) 161-173.
- [323] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** AlPO₄-Al₂O₃ catalysts with low alumina content. I. Structural and textural characterization of catalysts obtained with aqueous ammonia. *Appl. Cat.*, 96 (1993) 175-199.
- [324] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** AlPO₄-Al₂O₃ catalysts with low-alumina content. II. Acidity and catalytic activity in cyclohexene conversion and cumene cracking of catalysts obtained with aqueous ammonia *Appl. Cat.*, 104 (1993) 109-135.
- [325] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Urbano MR.** Chromium-aluminium orthophosphates. part 1.- structure, texture, surface acidity and catalytic activity in cyclohexene skeletal isomerization and cumene conversion of CrPO₄-AlPO₄ catalysts. *J. Matter Chem.*, 4 (1994) 311-317.
- [326] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Navío JA, Macías M.** Fluoride treatment of AlPO₄-Al₂O₃ catalysts. II. poisoning experiments by bases for cyclohexene conversion and cumene cracking. *Cat. Lett.*, 24 (1994) 293-301.
- [327] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Navío JA, Macías M.** J. Fluoride and sulfate treatment of AlPO₄-Al₂O₃ catalysts. Structure, texture, surface acidity, and catalytic performance in cyclohexene conversion and cumene cracking. *J. Cat.*, 104 (1994) 107-125.
- [328] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** AlPO₄ and AlPO₄-Al₂O₃ as heterogeneous catalysts in the preparation of 1,3-dioxolanes by acetalization of different carbonyl compounds. *J. Prakt. Chem.* 2, 336 (1994) 620-622.
- [329] **Campelo JM, García A, Herencia JF, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** conversion of alcohols (alpha-methylated series) on AlPO₄ catalysts. *J. Cat.*, 151 (1995) 307-314.
- [330] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Urbano MR.** Conversion of anisole in the presence of methanol over AlPO₄-Al₂O₃ catalysts modified with fluoride and sulfate anions. *React. Kinet. Cat. Lett.*, 54 (1995) 99-106.
- [331] **Bautista, F.M.; Campelo, J.M.; García, A.; Luna, D.; Marinas, J.M; Romero, A.A.;** Study on dry-media microwave azalactone synthesis on different supported KF catalysis: influence of textural and acid-base properties of supports. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 2 (2002) 227-234.

- [332] **Boey P-L, Maniam GP, Hamid SA.** Performance of calcium oxide as a heterogeneous catalyst in biodiesel production: A review. *Chemical Engineering Journal*, 168 (2011) 15–22.
- [333] **Robert O. Kuehl.** Diseño de Experimentos 2a. Editorial Thomson Learning, (2001).
- [334] **Wei L, Wei D, Dehua L.** Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 45 (2007) 122-127.
- [335] **Bouaid A, Martinez M, Aracil J.** A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. *Chem. Eng. J.*, 134 (2007) 93-99.
- [336] **Wang Y, Wu H, Zong MH.** Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Biores. Tech.*, 99 (2008) 7232-7237.
- [337] **Ghamgui H, Miled N, Rebai A, Karra-chaâbouni M, Gargouri Y.** Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. *Enz. Microbial Tech.*, 39 (2006) 717-723.
- [338] **Ferella F, Mazziotti G, De Michelis I, Stanisci V, Vegliò F.** Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. *Fuel*, 89 (2010) 36-42.
- [339] **Tat K, Teong K, Rahman A.** A glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: An optimization study via Response Surface Methodology. *Biores. Tech.*, 101 (2010) 965-969.
- [340] **Calero J, Verdugo C, Luna D, Sancho ED, Luna C, Posadillo A, Bautista FM, Romero AA.** Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation. *New Biotechnol*; 31 (2014) 596-601.
- [341] **Xie, W.; Huang, X.;** Synthesis of Biodiesel soybean oil using heterogeneous KF/ZnO catalyst. *Catalysis Letters*; 107 (2006) 53-59.
- [342] **Bo, X.; Guomin, X.; Lingfeng, C.; Ruiping, W.; Lijing, G.;** Transesterification of Palm Oil with Methanol to Biodiesel over a KF/Al₂O₃ Heterogeneous Base Catalyst *Energy Fuels*; 21 (2007) 3109–3112.
- [343] **Sun, H.; Hu, K.; Lou, H.; Zheng, X.;** Biodiesel Production from Transesterification of Rapeseed Oil Using KF/Eu₂O₃ as a Catalyst; *Energy Fuels*; 22 (2008) 2756–2760.

- [344] **Boz, N.; Degirmenbasi, N.; Kalyon, D.M.;** Conversion of biomass to fuel: Transesterification of vegetable oil to biodiesel using KF loaded nano-g-Al₂O₃ as catalyst; *Applied Catalysis B: Environmental*; 89 (2009) 590–596.
- [345] **Gao, L.; Xu, B.; Xiao, G.; Lv, J.;** Transesterification of Palm Oil with Methanol to Biodiesel over a KF/Hydrotalcite Solid Catalyst; *Energy Fuels*; 22 (2008) 3531-3535.
- [346] **Liu, X.; He, H.; Wang, Y.; Zhu, S.; Piao, X.;** Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst; *Fuel* 87 (2008) 216–221.
- [347] **Fan, M.; Zhang, P.; Ma, Q.;** Enhancement of biodiesel synthesis from soybean oil by potassium fluoride modification of a calcium magnesium oxides catalyst *Bioresource Technology*; 104 (2012) 447–450.
- [348] **Wan, T.; Yu, P.; Gong, S.; Li, Q.; Luo, Y.;** Application of KF/MgO as a heterogeneous catalyst in the production of biodiesel from rapeseed oil; *Korean J. Chem. Eng.*, 25 (2008) 998-1003.
- [349] **Calero J, Cumplido G, Luna D, Sancho ED, Luna C, Posadillo A, Bautista FM, Romero AA, Verdugo-Escamilla C.** Production of a Biofuel that Keeps the Glycerol as a Monoglyceride by Using Supported KF as Heterogeneous Catalyst. *Energies*, 7 (2014) 3764-3780
- [350] **Calero J, Luna D, Sancho ED, Luna C, Bautista FM, Romero AA, Posadillo A, Verdugo C.** Development of a new biodiesel that integrates glycerol, by using CaO as heterogeneous catalyst, in the partial methanolysis of sunflower oil. *Fuel*; 122 (2014) 94–102.

6. ANEXOS

6.1. Glosario

- **Aceite Vegetal Puro:** cualquier aceite que se puede mezclar con Diesel para ser usado como carburante. Los más utilizados son Girasol, Colza y Soja, y todos se pueden mezclar hasta un 10% con el Diesel.
- **Biocarburentes Sintéticos:** hidrocarburos sintéticos o sus mezclas, producidos a partir de la biomasa.
- **Biocombustible:** cualquier combustible que puede ser usado en mezcla con el Diesel o la Gasolina, pero que no se rige por ninguna normativa concreta.
- **Biodiesel:** combustible obtenido por la reacción de transesterificación (metanolisis o etanolisis), por la cual se obtiene FAEE o FAME y que se rige por la normativa europea 14214.
- **Biodimetileter:** DME (dimetiléter) producido a partir de la biomasa.
- **Bioetanol:** alcohol etílico producido a partir de productos agrícolas o de origen vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación o transformación química.
- **BioETBE:** ETBE (etil ter-butil éter) producido a partir del bioetanol.
- **Biogás:** combustible gaseoso producido por digestión anaerobia de biomasa.
- **Biohidrógeno:** hidrógeno producido a partir de la biomasa u otras fuentes renovables de energía.
- **Biometanol:** alcohol metílico obtenido a partir de productos de origen agrícola o vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación o transformación química.
- **Conversión:** porcentaje de TG (triglicérido) transformado a FAME o FAEE (biocombustible).
- **Densidad:** La densidad del biodiesel depende del contenido en ésteres y de la cantidad remanente de alcohol.
- **Diglicérido:** DG, producto obtenido en el primer paso de la reacción de transesterificación junto con una molécula de FAME o FAEE.
- **DMC-BioD:** combustible sintetizado considerado como un combustible alternativo totalmente producido con recursos renovables.
- **FAEE:** de las siglas inglesas Fatty Acid Ethyl Ester, Ester Etílico de Ácidos Grasos, lo que se denomina biodiesel.
- **FAME:** de las siglas inglesas Fatty Acid Methyl Ester, Ester Metílico de Ácidos Grasos, lo que se denomina biodiesel.

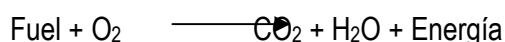
- **Glicerina:** producto obtenido en la reacción de transesterificación junto con el FAEE o FAME, pero debido a la gran cantidad de glicerina existente en el mercado, actualmente se considera como un residuo.
- **Glipérol:** este biocombustible se compone de una mezcla de tres moléculas de FAME y una molécula de triacetina, obtenidos después de la interesterificación de un mol de TG con tres moles de acetato de metilo.
- **Humedad:** el biocombustible contaminado con agua puede causar la corrosión del motor o reaccionar con glicéridos para producir jabones y glicerina.
- **Índice De Acidez:** el índice de acidez es una medida de la concentración de ácidos grasos libres.
- **Índice De Cetano:** el índice de cetano es un importante indicador de la calidad del biodiesel. Un índice de cetano elevado garantiza un buen control de la combustión, aumento del rendimiento y mejora de los arranques en frío. Es el equivalente al octano de la gasolina.
- **Índice De Saponificación:** representa los miligramos de hidróxido potásico necesarios para saponificar un gramo de biodiesel.
- **Índice De Yodo:** se mide como el yodo adsorbido en gramos por cada 100 g de muestra, y se relaciona con el nivel de insaturación presente en el aceite, es decir, cuanto mayor sea el contenido en insaturaciones más elevado es el índice de yodo.
- **Monoglicérido:** producto obtenido en el segundo paso de la reacción de transesterificación junto con 2 moléculas de FAME o FAEE.
- **Punto De Inflamación:**
- **Punto De Obstrucción De Filtro En Frío:**
- **Selectividad:** es la coincidencia en los picos de la franja cromatográfica entre el cromatograma del petrodiesel y el cromatograma del biocombustible.
- **Transesterificación:** la transesterificación es el proceso de intercambiar el grupo alcoxi de un alcohol. Estas reacciones son frecuentemente catalizadas mediante la adición de un ácido o una base.
- **Triglicérido:** es la molécula que forma el aceite vegetal.
- **Viscosidad:** se entiende por viscosidad, la resistencia que ofrecen las capas de una masa líquida para el desplazamiento paralelo de unas sobre otras. La viscosidad de los combustibles usados en los coches en Europa debe estar comprendida entre 2-6 cSt.

6.2. Memoria de la estancia en la NUI Galway

A continuación se describen los objetivos y la metodología desarrollados en mi estancia en el "COMBUSTION CHEMISTRY CENTRE" de la Universidad Nacional de Irlanda en Galway.

Objetivos:

El objetivo principal de esta investigación ha sido complementar parte de las investigaciones desarrolladas previamente en el centro receptor. Estas investigaciones se centran en la oxidación de compuestos que forman parte de los combustibles derivados del petróleo.



Actualmente se están desarrollando estudios con cicloalcanos (ciclohexano y ciclopentano principalmente), debido a que los combustibles (diesel, gasolina y queroseno) contienen entre un 15 y un 35% de cicloalcanos. La simulación de estos combustibles usados en motores es prácticamente imposible debido a que están compuestos por cientos de compuestos Hidrocarbonados. Por esta razón, el ciclopentano ha sido usado en mi trabajo desarrollado en el Combustion Chemistry Centre (NUIG), para conocer la cinética de este combustible. Se ha elegido el ciclopentano (C₅H₁₀) porque es el cicloalcano más simple presente en estos combustibles. Para describir la cinética completa de este combustible, se han utilizado tanto una máquina de compresión rápida (RCM, rapid compression machine) como un tubo de choque (shock-tube).

Metodología:

Los experimentos han sido realizados en un tubo de choque (Shock-tube), que se muestra en la Figura 1, y una máquina de compresión rápida (RCM, rapid compression machine), como la que se muestra en la Figura 3.



Figura 1. Shock-tube.

El tubo de choque (Shock-tube) tiene una sección de impulsado (driven section, situado a la izquierda de la imagen) con un diámetro interior de 5.7m y 3m de sección de conducción (driver section, situado a la derecha de la imagen), ambas con un diámetro interior de 6.35cm. El tubo de choque tiene unos cables “traductores” de presión (Fluke PM 6666), con los que se mide la presión final y el tiempo de retroceso en la ignición (IDT, Ignition Delay Time). En la Figura 2 se muestra un esquema completo de la máquina shock tube.

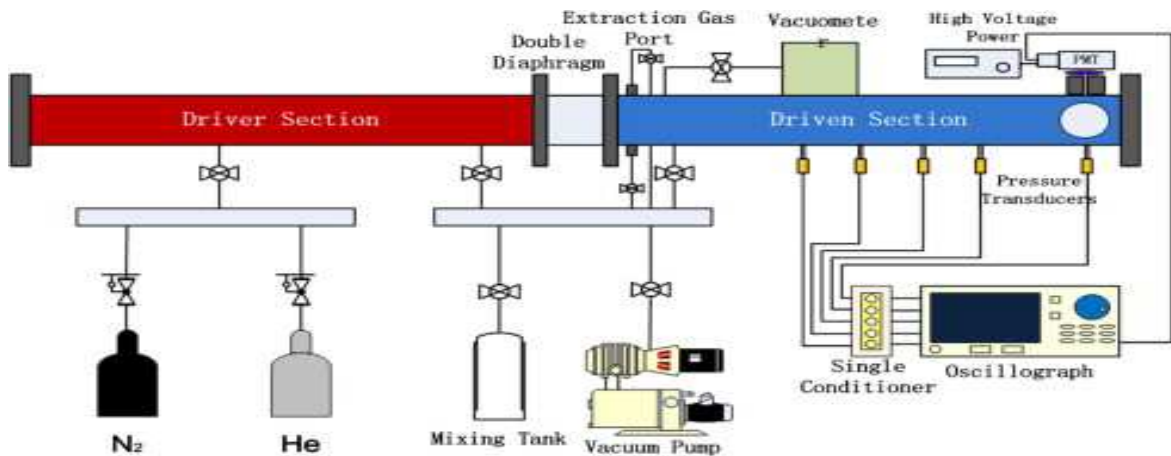


Figura 2. Esquema completo de la máquina shock tube.



Figura 3. Máquina de compresión rápida.

La pareja de pistones de compresión rápida (RCM) usada tiene una efectiva compresión en un ratio aproximado de 10:1 y un tiempo de compresión de 16 ms. En la Figura 4 se muestra un esquema completo de una parte de la RCM, como son simétricas, se conoce el sistema integro.

La cámara de combustión de acero inoxidable (Figura 4) puede ser cargada con una presión inicial de 2 bares, teniendo como tolerancia máxima de trabajo los 200 bares y un rango de temperaturas comprendido entre 600-1100K.

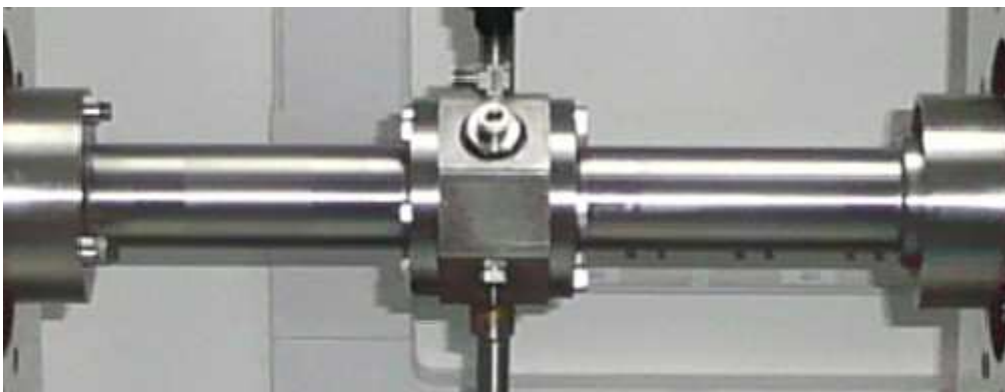


Figura 4. Cámara de combustión.

Las grietas de los pistones (Figura 5) utilizados para reducir los gases centrales durante la compresión, lo que consigue una temperatura homogénea después de la compresión. Se suele usar una cinta de calefacción, ya que las temperaturas obtenidas en la cámara de combustión alcanzan los 380K.



Figura 5. Grieta de un pistón.

La presión dinámica en la cámara de combustión fue medida por un traductor de presión (Kistler 603B) en combinación con un amplificador (Kistler 5007). Los perfiles presión/tiempo son grabados en un osciloscopio (Nicolet Sigma 90-4) con una resolución de 1 Megamuestra cada segundo.

Resultados:

El trabajo desarrollado durante mi estancia se basaba en describir la cinética del ciclopentano. Para describir esta cinética se mide el retroceso de la ignición una vez que se ha oxidado el ciclopentano. Con ambas máquinas la medida de la ignición es similar, pero en la Figura 6 pongo un ejemplo de cómo se mediría en el software utilizado para la RCM, y siendo filtrada la señal a través de Origin 8.5.

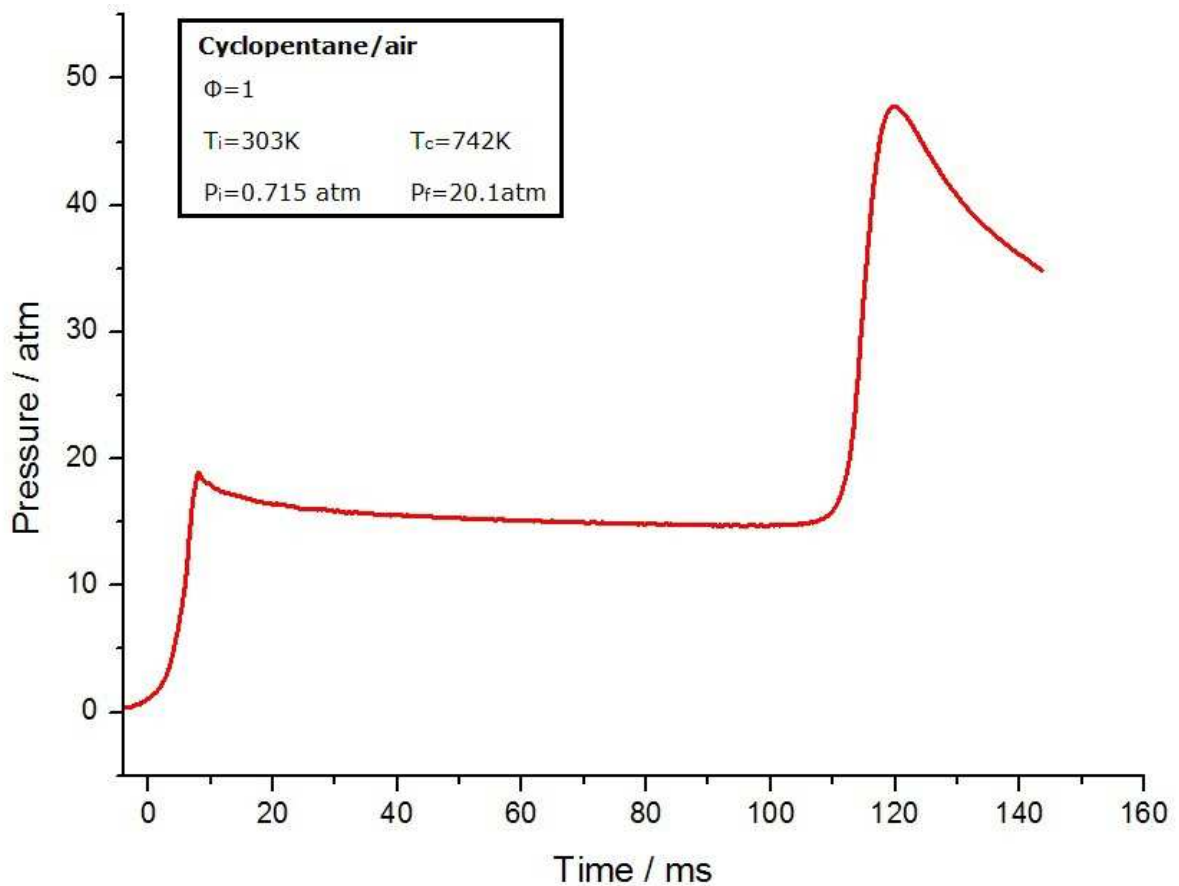


Figura 6. Ejemplo de medición del IDT con la RCM.

El retroceso de la ignición (IDT) sería la diferencia en milisegundos entre ambos picos, siendo el primer pico la presión obtenida (en este caso es 20.1 atm) y el segundo la ignición provocada.

Podemos separar mi trabajo allí con el shock tube y con la rapid compression machine:

-RAPID COMPRESSION MACHINE

Hemos determinado 2 presiones ($P_1=20\text{atm}$ y $P_2=40\text{atm}$) y 3 diferentes radio de equivalencia (es la relación existente entre el ciclopentano y el oxígeno, y han sido 0.5, 1 y 2).

Con estas características hemos realizado el estudio completo del ciclopentano, en un rango de temperaturas entre el inicio de la ignición y los 950K. Inicialmente se realizó con N_2 y para ampliar el rango de temperatura se mezcló con CO_2 para temperaturas más bajas y con Argón para temperaturas más altas.

A continuación se muestran los datos obtenidos con la RCM, las Figura 7 (P=20atm) y Figura 8 (P=40atm).

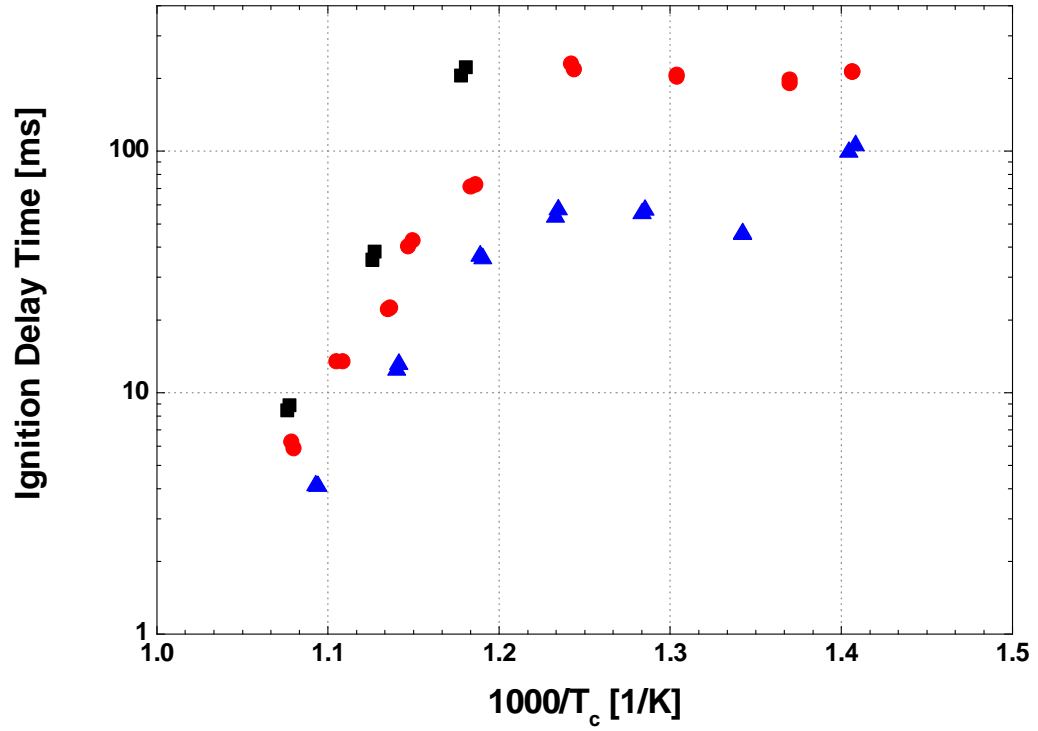


Figura 7. Ignición del ciclopentano con presión final de 20 atm y ■ $\Phi=0.5$; ● $\Phi=1$; ▲ $\Phi=2$.

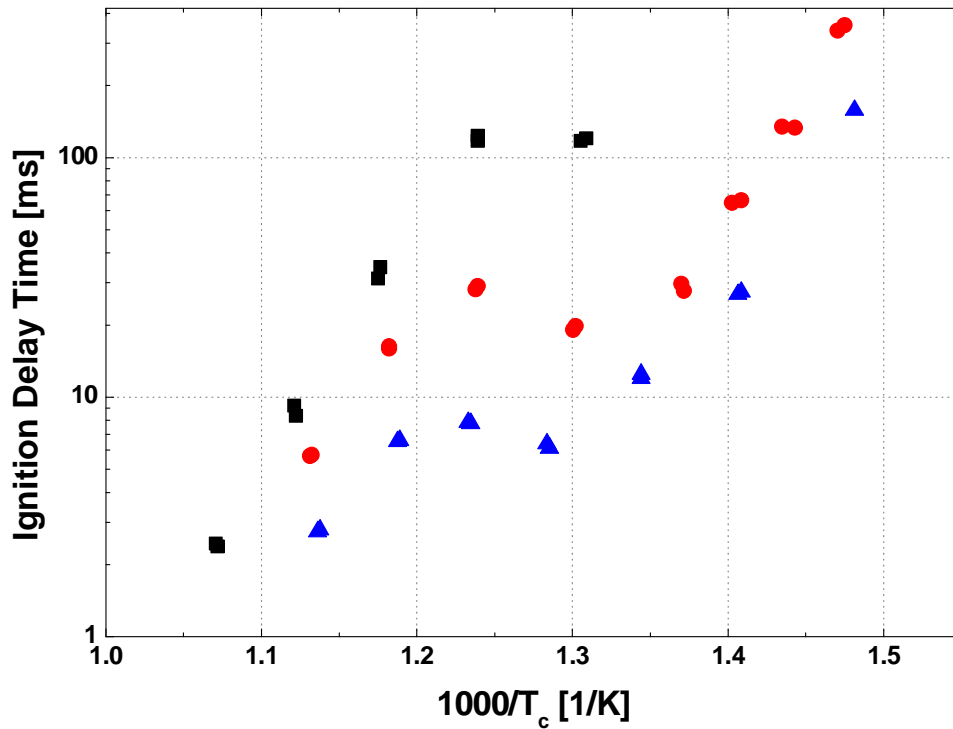


Figura 8. Ignición del ciclopentano con presión final de 40 atm y ■ $\Phi=0.5$; ● $\Phi=1$; ▲ $\Phi=2$.

-SHOCK TUBE

Para completar el estudio se ha realizado un estudio con el shock tube comparándolo con una publicación de 2008 (Daley, S. M.; Berkowitz, A. M.; Oehlschlaeger, M. A. *Int J ChemKinet*, **2008**, 40, 624). En esta publicación se hace un estudio de la oxidación del ciclopentano en un shock tube a las presiones de 13 y 50 atm. Los resultados obtenidos son muy interesantes debido a la similitud con los de referencia, como se muestran en la Figura 9 y Figura 10.

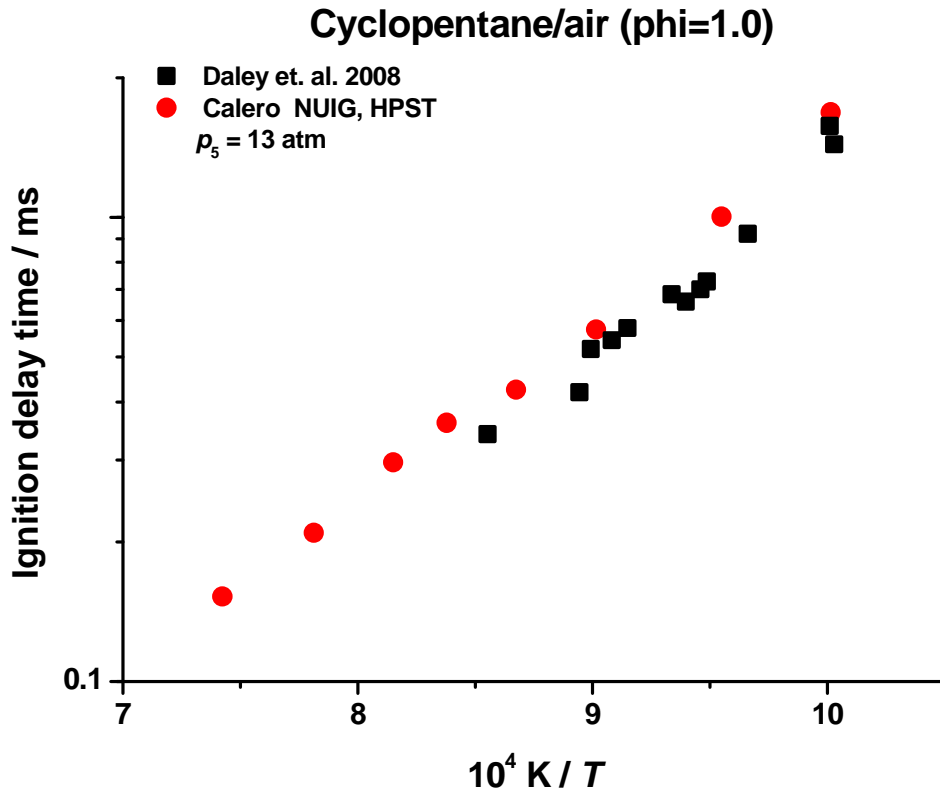


Figura 9. Ignición del ciclopentano con presión de 13 atm y $\Phi=1$ (■ Mis datos y ♦ Datos de referencia).

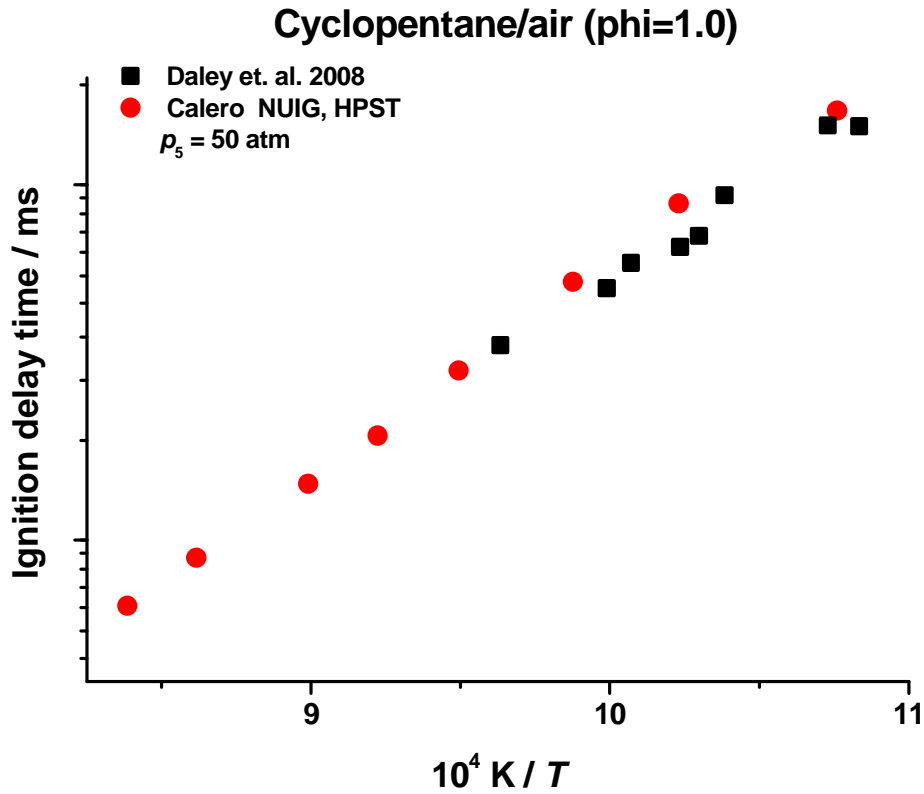


Figura 10. Ignición del ciclopentano con presión de 50 atm y $\Phi=1$ (■ Mis datos y ♦ Datos de referencia).

Además se ha continuado con las temperaturas de los resultados de la rapid compression machine para tener el comportamiento completo de este fuel (ciclopentano) oxidándose en un amplio rango de temperaturas, desde la ignición hasta los 1200 K, con las presiones de 20 y 40 atm y el radio de equivalencia fuel/oxígeno de 1 (Figura 11-13).

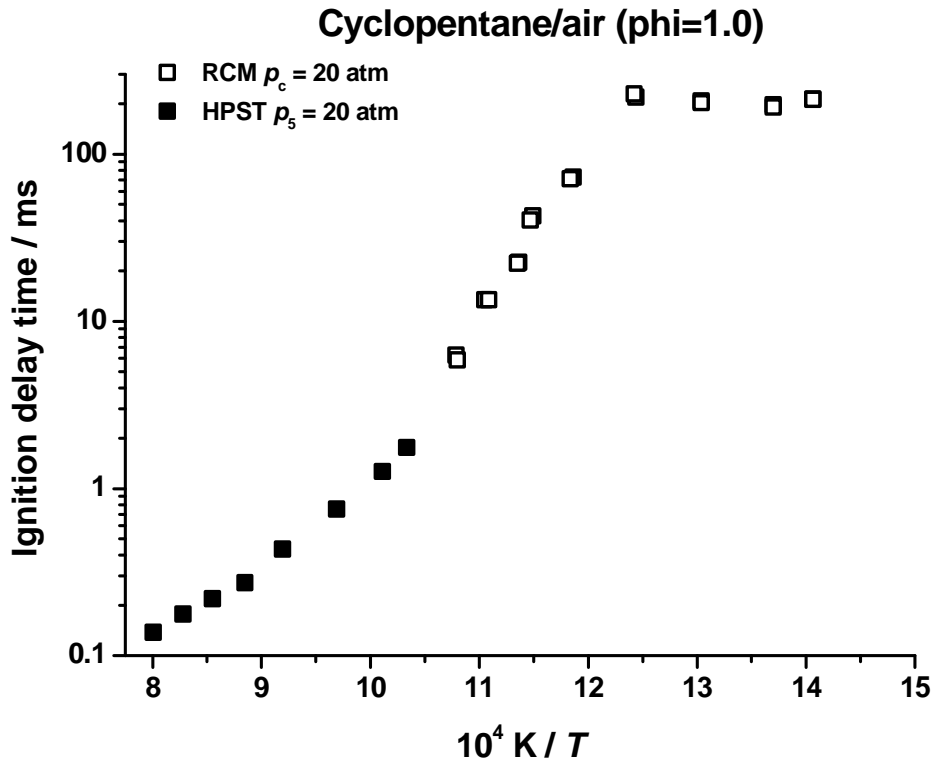


Figura 11. Ignición completa del ciclopentano con presión de 20 atm y $\Phi=1$.

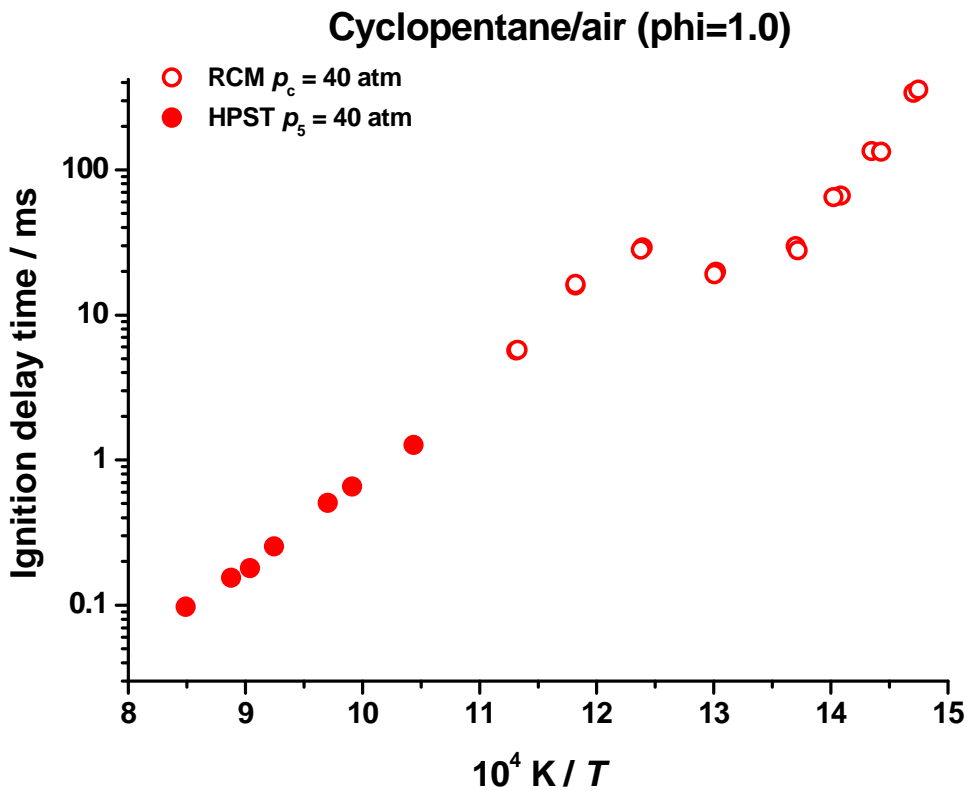


Figura 12. Ignición completa del ciclopentano con presión de 40 atm y $\Phi=1$.

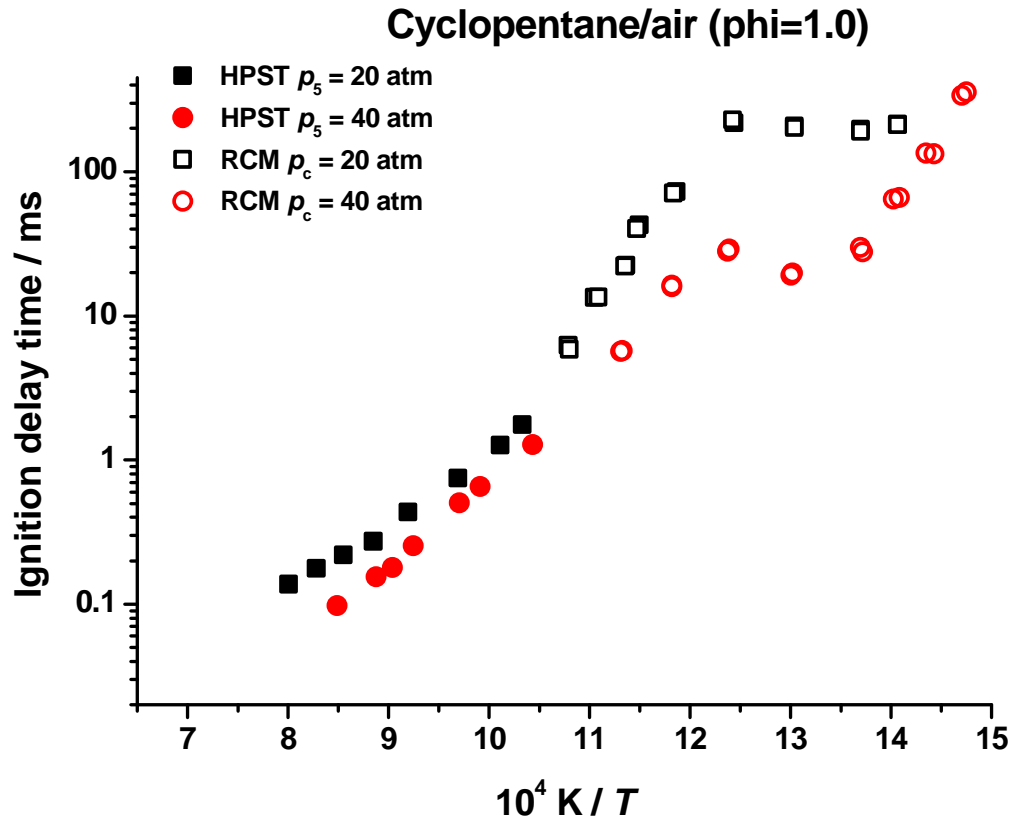


Figura 13. Comparación de la Ignición completa del ciclopentano con presión de 20 y 40 atm, con $\Phi=1$.

6.3. Otras aportaciones científicas

- Artículos publicados

12) Juan Calero, Diego Luna, Enrique D. Sancho, Carlos Luna, Felipa M. Bautista, Antonio A. Romero, Alejandro Posadillo, Julio Berbel, Cristóbal Verdugo-Escamilla; **AN OVERVIEW ON GLYCEROL-FREE PROCESSES FOR THE PRODUCTION OF RENEWABLE LIQUID BIOFUELS, APPLICABLE IN DIESEL ENGINES.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* (2014) doi: 10.1016/j.rser.2014.11.007

11) Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Enrique D. Sancho; Diego Luna; Juan Calero; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **PRODUCTION OF A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL WITHOUT GLYCEROL GENERATION, BY USING NOVOZYM 435, AN IMMOBILIZED CANDIDA ANTARCTICA LIPASE.** *Bioresources and Bioprocessing.* (2014) doi:10.1186/s40643-014-0011-y

10) Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Enrique D. Sancho; Diego Luna; Juan Calero; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **BIOCATALYTIC BEHAVIOUR OF IMMOBILIZED RHIZOPUS ORYZAE LIPASE IN THE 1,3-SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL TO OBTAIN A BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL.** *Molecules.* (2014) doi:10.3390/molecules190811419

9) Juan Calero; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **ACHIEVEMENT OF A BIOFUEL-LIKE BIODIESEL BY REGIOSELECTIVE TRANSESTERIFICATION OF SUNFLOWER OIL WITH MUCOR MIEHEI LIPASE.** *New Biotechnology.* (2014) doi: 10.1016/j.nbt.2014.05.1834

8) Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Enrique D. Sancho; Diego Luna; Juan Calero; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **ENZYMATIC PRODUCTION OF BIODIESEL THAT AVOIDS GLYCEROL AS BYPRODUCT, BY USING IMMOBILIZED RHIZOPUS ORYZAE LIPASE.** *New Biotechnology.* (2014) doi: 10.1016/j.nbt.2014.05.1831

7) Juan Calero; Gema Cumplido; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero; Cristóbal Verdugo. **PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT KEEPS THE GLYCERIN AS MONOGLYCERIDES BY USING SUPPORTED KF AS HETEROGENEOUS CATALYST.** *Energies.* (2014) doi: 10.3390/en7063764

6) Carlos Luna, Cristóbal Verdugo, Enrique D. Sancho, Diego Luna, Juan Calero, Alejandro Posadillo, Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **A BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL OBTAINED BY USING A LIPASE FROM RHIZOPUS ORYZAE, OPTIMIZED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY.** *Energies*. (2014) doi: 10.3390/en7053383

5) Juan Calero, Cristóbal Verdugo, Diego Luna, Enrique D. Sancho, Carlos Luna, Alejandro Posadillo, Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL WITH LIPOZYME RM IM, AN IMMOBILIZED RHIZOMUCOR MIEHEI LIPASE, TO OBTAIN A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL, WHICH AVOIDS GLYCEROL PRODUCTION THROUGH THE MONOGLYCERIDE FORMATION.** *New Biotechnology*. (2014) doi: 10.1016/j.nbt.2014.02.008

4) Juan Calero, Diego Luna, Enrique D. Sancho, Carlos Luna, Felipa M. Bautista, Antonio A. Romero, Alejandro Posadillo, Cristóbal Verdugo. **DEVELOPMENT OF A NEW BIODIESEL THAT INTEGRATES GLYCEROL, BY USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYST, IN THE PARTIAL METHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL.** *Fuel*. (2014) doi:10.1016/j.fuel.2014.01.033

3) Diego Luna, Juan Calero, Enrique D. Sancho, Carlos Luna, Alejandro Posadillo, Felipa M. Bautista, Antonio A. Romero, Julio Berbel and Cristóbal Verdugo. **TECHNOLOGICAL CHALLENGES FOR THE PRODUCTION OF BIODIESEL IN ARID LANDS.** *Journal of Arid Environments*. (2014) doi:10.1016/j.jaridenv.2013.11.014

2) Carlos Luna, Enrique D. Sancho, Diego Luna, Verónica Caballero, Juan Calero, Alejandro Posadillo, Cristóbal Verdugo, Felipa M. Bautista and Antonio A. Romero. **BIOFUEL THAT KEEPS GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE BY 1,3-SELECTIVE ETHANOLYSIS WITH PIG PANCREATIC LIPASE COVALENTLY IMMOBILIZED ON ALPO₄ SUPPORT.** *Energies*. (2013) doi:10.3390/en6083879

1) Diego Luna; Alejandro Posadillo; Cristóbal Verdugo; Felipa M^a Bautista; Antonio A. Romero; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Juan Calero. **NEW BIOFUEL INTEGRATING GLYCEROL INTO ITS COMPOSITION THROUGH THE USE OF COVALENT IMMOBILIZED PIG**

PANCREATIC LIPASE. *International Journal of Molecular Sciences.* (2012)

doi:10.3390/ijms130810091

- **Capítulos de libro**

18) Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Enrique D. Sancho; Diego Luna; Juan Calero; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero. **INFLUENCIA DEL PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN EN EL RENDIMIENTO BIOCATALÍTICO DE UNA LIPASA DE PHIZOPUS ORYZAE EN LA ETANOLISIS 1,3-SELECTIVA DE TRIGLICÉRIDOS PARA OBTENER UN NUEVO TIPO DE BIODIÉSEL.** / *Encuentro de jóvenes investigadores de la secet: investigación en catálisis para el futuro.* (2014) ISBN: 978-84-941418-4-3

17) Juan Calero; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero. **SÍNTESIS DE UN BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA COMO MONOGLICÉRIDO, USANDO LIPASA MUCOR MIEHEI.** / *Encuentro de jóvenes investigadores de la secet: investigación en catálisis para el futuro.* (2014) ISBN: 978-84-941418-4-3

16) Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Enrique D. Sancho; Diego Luna; Juan Calero; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero. **LIPASE EXTRACTS FROM WILD MICROBIAL STRAINS TO PRODUCE BIOFUEL WITHOUT GLYCEROL.** *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends.* (2014) ISBN: 978-90-8686-243-6

15) Juan Calero; Gema Cumplido; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero; Cristóbal Verdugo. **PRODUCTION OF BIODIESEL-LIKE BIOFUEL BY ENZYMATIC EXTRACTS FROM WILD STRAINS IN VEGETABLE OIL ENVIRONMENTS.** *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends.* (2014) ISBN: 978-90-8686-243-6

14) C. Luna, E. D. Sancho, D. Luna, J. Calero, C. Verdugo, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero. **PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE UN NUEVO TIPO DE BIODIESEL QUE NO PRODUCE GLICERINA COMO SUBPRODUCTO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES LIPASAS.** *VI JORNADAS DE DIVULGACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA.* (2014) ISBN: 978-84-940063-2-6

- 13) C. Luna, E. D. Sancho, D. Luna, J. Calero, C. Verdugo, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero. **PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPASE.** *GPE 2014. PROGRAM AND BOOK OF ABSTRACTS.* (2014) ISBN: 987-84-15107-50-7
- 12) J. Calero, D. Luna, E. D. Sancho, C. Luna, C. Verdugo, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero. **ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL BY USING *MUCOR MIEHEI* LIPASE, TO ACHIEVE A BIOFUEL LIKE THE BIODIESEL, WHICH INTEGRATES THE GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE.** *GPE 2014. PROGRAM AND BOOK OF ABSTRACTS.* (2014) ISBN: 987-84-15107-50-7
- 11) Carlos Luna, Cristobal Verdugo, Enrique D. Sancho, Diego Luna, Juan Calero, Alejandro Posadillo, Felipa M. Bautista, Antonio A. Romero. **BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL OBTAINED BY USING A LIPASE FROM *RHIZOPUS ORYZAE*, OPTIMIZED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY.** *CONFERENCE PROCEEDINGS PAPER - ENERGIES "WHITHER ENERGY CONVERSION? PRESENT TRENDS, CURRENT PROBLEMS AND REALISTIC FUTURE SOLUTIONS".* (2014) doi: 10.3390/ece-1-e008
- 10) Juan Calero; Gema Cumplido; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero; Cristóbal Verdugo. **PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT KEEPS THE GLYCERIN AS MONOGLYCERIDES BY USING SUPPORTED KF AS HETEROGENEOUS CATALYST.** *CONFERENCE PROCEEDINGS PAPER - ENERGIES "WHITHER ENERGY CONVERSION? PRESENT TRENDS, CURRENT PROBLEMS AND REALISTIC FUTURE SOLUTIONS".* (2014) doi: 10.3390/ece-1-e008
- 9) Calero, Juan; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Luna, Carlos; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador. **OPTIMIZATION OF A LOW COST COMMERCIAL MICROBIAL LIPASE (LIPOPAN 50 BG, NOVOZYMES) FOR THE PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERINE.** *LIBRO DE RESUMENES: VII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE BIOTECNÓLOGOS-BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013.* (2013) ISBN: 84-695-8178-3

- 8) Luna, Carlos; Sancho, Enrique; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador. **NEW BIOFUEL OBTENTION BY APPLICATION OF SELECTED WILD MICROBIAL LIPASES.** *LIBRO DE RESUMENES: VII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE BIOTECNÓLOGOS-BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013.* (2013) ISBN: 84-695-8178-3
- 7) Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique; Luna, Carlos; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Posadillo, Alejandro; Verdugo, Cristóbal. **DEVELOPMENT OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN BY USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYST.** *10TH CONGRESS ON CATALYSIS APPLIED TO FINE CHEMICALS.* (2013) ISBN: 978-84-9521229008
- 6) Luna, Carlos; Sancho, Enrique; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Posadillo, Alejandro; Verdugo, Cristóbal. **PRODUCTION OF BIOFUELS THAT INTEGRATE GLYCERINE THROUGH THE APPLICATION OF WILD LIPASES.** *10TH CONGRESS ON CATALYSIS APPLIED TO FINE CHEMICALS.* (2013) ISBN: 978-84-9521229008
- 5) Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique; Luna, Carlos; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal. **TECHNOLOGICAL POSSIBILITIES OF CALCIUM OXIDE AS HETEROGENEOUS CATALYST IN THE PRODUCTION OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN AFTER PARTIAL TRANSESTERIFICATION OF SUNFLOWER OIL.** *2TH IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES.* (2013) ISBN: 978-84-92876-21-1
- 4) Luna, Carlos; Sancho, Enrique; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal. **PRODUCTION OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN TROUGH SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL USING LIPASES FROM WILD MICROORGANISMS.** *2TH IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES.* (2013) ISBN: 978-84-92876-21-1
- 3) Cumplido, Gema; Luna, Diego; Sancho, Enrique; Luna, Carlos; Calero, Juan; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal. **OBTENCIÓN DE**

UN BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA EMPLEANDO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO KF SOPORTADO. *IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES.* (2013) ISBN: 978-84-15105-81-7

2) Luna, Carlos; Sancho, Enrique; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema; Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal. **OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LIPASAS SILVESTRES.** *IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES.* (2013) ISBN: 978-84-15105-81-7

1) Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique; Luna, Carlos; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal. **SÍNTESIS DE UN NUEVO BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA EMPLEANDO ÓXIDO DE CALCIO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO.** *IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES.* (2013) ISBN: 978-84-15105-81-7

- **Comunicaciones en congresos internacionales**

16) Co-autores: J. Calero; D. Luna; E. D. Sancho; C. Luna; C. Verdugo; A. Posadillo; F. M. Bautista and A. A. Romero.

Título: ACHIEVEMENT OF A BIOFUEL-LIKE BIODIESEL BY REGIOSELECTIVE TRANSESTERIFICATION OF SUNFLOWER OIL WITH *MUCOR MIEHEI* LIPASE.

Tipo de participación: Poster

Congreso: 16TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY (ECB16)

Lugar de celebración: EDINBURGH (SCOTLAND)

Fecha: 13-16/7/2014

15) Co-autores: C. Luna, C. Verdugo, E. D. Sancho, D. Luna, J. Calero, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero.

Título: ENZYMATIC PRODUCTION OF BIODIESEL THAT AVOIDS GLYCEROL AS BYPRODUCT, BY USING IMMOBILIZED *RHIZOPUS ORYZAE* LIPASE.

Tipo de participación: Poster

Congreso: 16TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY (ECB16)

Lugar de celebración: EDINBURGH (SCOTLAND)

Fecha: 13-16/7/2014

14) Co-autores: C. Luna, E. D. Sancho, D. Luna, J. Calero, C. Verdugo, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero.

Título: PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPASE.

Tipo de participación: Poster

Congreso: 4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON GREEN PROCESS ENGINEERING

Lugar de celebración: SEVILLA (SPAIN)

Fecha: 7-10/4/2014

13) Co-autores: J. Calero, D. Luna, E. D. Sancho, C. Luna, C. Verdugo, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero.

Título: ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL BY USING *MUCOR MIEHEI* LIPASE, TO ACHIEVE A BIOFUEL LIKE THE BIODIESEL, WHICH INTEGRATES THE GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE

Tipo de participación: Poster

Congreso: 4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON GREEN PROCESS ENGINEERING

Lugar de celebración: SEVILLA (SPAIN)

Fecha: 7-10/4/2014

12) Co-autores: Carlos Luna, Cristobal Verdugo, Enrique D. Sancho, Diego Luna, Juan Calero, Alejandro Posadillo, Felipa M. Bautista, Antonio A. Romero.

Título: BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL OBTAINED BY USING A LIPASE FROM *RHIZOPUS ORYZAE*, OPTIMIZED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Tipo de participación: PowerPoint (Conference On-line)

Congreso: 1st INTERNATIONAL E-CONFERENCE ON ENERGIES

Visualizado: <http://sciforum.net/conference/ece-1> (On-line)

Fecha: 14-31/3/2014

11) Co-autores: Juan Calero; Gema Cumplido; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero; Cristóbal Verdugo.

Título: PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT KEEPS THE GLYCERIN AS MONOGLYCERIDES BY USING SUPPORTED KF AS HETEROGENEOUS CATALYST.

Tipo de participación: PowerPoint (Conference On-line)

Congreso: 1st INTERNATIONAL E-CONFERENCE ON ENERGIES

Visualizado: <http://sciforum.net/conference/ece-1> (On-line)

Fecha: 14-31/3/2014

10) Co-autores: Calero, Juan; Verdugo, Cristóbal; Luna, Diego; Sancho, Enrique David; Luna, Carlos; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel.

Título: SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL WITH LIPOZYME RM IM, AN IMMOBILIZED *RHIZOMUCOR MIEHEI* LIPASE TO OBTAIN A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE.

Tipo de participación: Poster

Congreso: 2nd CONGRESS ON APPLIED SYNTHETIC BIOLOGY IN EUROPE

Lugar de celebración: MÁLAGA (SPAIN)

Fecha: 25-27/11/2013

9) Co-autores: Luna, Carlos; Verdugo, Cristóbal; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel.

Título: PRODUCTION OF A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL WITHOUT GLYCEROL GENERATION, BY USING NOVOZYME 435, AN IMMOBILIZED *CANDIDA ANTARCTICA* LIPASE

Tipo de participación: Poster

Congreso: 2nd CONGRESS ON APPLIED SYNTHETIC BIOLOGY IN EUROPE

Lugar de celebración: MÁLAGA (SPAIN)

Fecha: 25-27/11/2013

8) Co-autores: Luna, Carlos; Escobar-Niño, Almudena; Sancho, Enrique David; Mellado, Encarnación; Cánovas, David; Luna, Diego; Calero, Juan; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: OBTENTION OF LIPASIDIC ENZYMATIC EXTRACTS FROM WILD STRAINS SAMPLED IN VEGETABLE OIL ENVIRONMENTS, AS THEIR EVALUATION AND SELECTION AS BIOCATALYSTS IN THE ETHANOLYSIS OF TRIGLYCERIDES TO PRODUCE BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERINE.

Tipo de participación: Poster p134

Congreso: V INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY (BIOMICROWORLD 2013)

Lugar de celebración: MADRID (SPAIN)

Fecha: 2-4/10/2013

7) Co-autores: Luna, Carlos; Sánchez, Leire; Sancho, Enrique David; Mellado, Encarnación; Cánovas, David; Luna, Diego; Calero, Juan; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: LIPASIDIC ENZYMATIC EXTRACTS FROM WILD MICROBIAL STRAINS SAMPLED AND SELECTED IN ANIMAL FATS ENVIRONMENTS, APPLIED AS BIOCATALYSTS TO PRODUCE BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERINE.

Tipo de participación: Poster p109

Congreso: V INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY (BIOMICROWORLD 2013)

Lugar de celebración: MADRID (SPAIN)

Fecha: 2-4/10/2013

6) Co-autores: Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique David; Luna, Carlos; Cumplido, Gema; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Posadillo, Alejandro; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: BIOFUEL SYNTHESIS FREE OF GLYCEROL USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYSTS

Tipo de participación: Poster p54

Congreso: 14TH CONGRESS TRENDS IN NANOTECHNOLOGY

Lugar de celebración: SEVILLA (SPAIN)

Fecha: 9-13/9/2013

5) Co-autores: Luna, Carlos; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: SYNTHESIS OF A BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN BY USING HETEROGENEOUS SUPPORTED KF CATALYSTS.

Tipo de participación: Poster p58

Congreso: 14TH CONGRESS TRENDS IN NANOTECHNOLOGY

Lugar de celebración: SEVILLA (SPAIN)

Fecha: 9-13/9/2013

4) Co-autores: Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique David; Luna, Carlos; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Posadillo, Alejandro; Verdugo, Cristóbal.

Título: DEVELOPMENT OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN BY USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYST.

Tipo de participación: Poster p92

Congreso: 10TH CONGRESS ON CATALYSIS APPLIED TO FINE CHEMICALS

Lugar de celebración: TURKU/ABO (FINLAND)

Fecha: 16-19/6/2013

3) Co-autores: Luna, Carlos; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Posadillo, Alejandro; Verdugo, Cristóbal.

Título: PRODUCTION OF BIOFUELS THAT INTEGRATE GLYCERINE THROUGH THE APPLICATION OF WILD LIPASES.

Tipo de participación: Poster p13

Congreso: 10TH CONGRESS ON CATALYSIS APPLIED TO FINE CHEMICALS

Lugar de celebración: TURKU/ABO (FINLAND)

Fecha: 16-19/6/2013

2) Co-autores: Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique David; Luna, Carlos; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: TECHNOLOGICAL POSSIBILITIES OF CALCIUM OXIDE AS HETEROGENEOUS CATALYST IN THE PRODUCTION OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN AFTER PARTIAL TRANSESTERIFICATION OF SUNFLOWER OIL

Tipo de participación: Poster 3.14

Congreso: 2TH IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES

Lugar de celebración: JAEN (SPAIN)

Fecha: 10-12/4/ 2013

1) Co-autores: Luna, Carlos; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema, Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: PRODUCTION OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN THROUGH SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL USING LIPASES FROM WILD MICROORGANISMS

Tipo de participación: Poster 3.13

Congreso: 2TH IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES

Lugar de celebración: JAEN (SPAIN)

Fecha: 10–12/4/ 2013

- **Comunicaciones en congresos nacionales**

- 11) Co-autores: Calero, Juan; Banyon, Colin; Curran, Henry J.
Título: STUDY OF CYCLOPENTANE USING A RAPID COMPRESSION MACHINE AT LOW-TEMPERATURE IGNITION
Tipo de participación: Póster (P46-IT)
Congreso: IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES
Lugar de celebración: CORDOBA Fecha: 5y6/02/2015
- 10) Co-autores: Juan Calero; Diego Luna; Enrique D. Sancho; Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero.
Título: SÍNTESIS DE UN BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA COMO MONOGLICÉRIDO, USANDO LIPASA MUCOR MIEHEI.
Tipo de participación: Póster
Congreso: I ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA SECAT: INVESTIGACIÓN EN CATÁLISIS PARA EL FUTURO.
Lugar de celebración: MÁLAGA Fecha: 22-24/06/2014
- 9) Co-autores: Carlos Luna; Cristóbal Verdugo; Enrique D. Sancho; Diego Luna; Juan Calero; Alejandro Posadillo; Felipa M. Bautista; Antonio A. Romero.
Título: INFLUENCIA DEL PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN EN EL RENDIMIENTO BIOCATALÍTICO DE UNA LIPASA DE PHIZOPUS ORYZAE EN LA ETANOLISIS 1,3-SELECTIVA DE TRIGLICÉRIDOS PARA OBTENER UN NUEVO TIPO DE BIODIÉSEL.
Tipo de participación: Póster
Congreso: I ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA SECAT: INVESTIGACIÓN EN CATÁLISIS PARA EL FUTURO.
Lugar de celebración: MÁLAGA Fecha: 22-24/06/2014
- 8) Co-autores: C. Luna, E. D. Sancho, D. Luna, J. Calero, C. Verdugo, A. Posadillo, F. M. Bautista, A. A. Romero.
Título: PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE UN NUEVO TIPO DE BIODIESEL QUE NO PRODUCE GLICERINA COMO SUBPRODUCTO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES LIPASAS.
Tipo de participación: Oral + Póster

Congreso: VI JORNADAS DE DIVULGACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Lugar de celebración: CÓRDOBA

Fecha: 8-9/05/2014

7) Co-autores: Calero, Juan; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Luna, Carlos; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: OPTIMIZATION OF A LOW COST COMMERCIAL MICROBIAL LIPASE (LIOPAN 50 BG, NOVOZYMES) FOR THE PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERINE.

Tipo de participación: Póster (PS8)

Congreso: VII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE BIOTECNÓLOGOS BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013

Lugar de celebración: SEVILLA

Fecha: 10-12/07/2013

6) Co-autores: Luna, Carlos; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: NEW BIOFUEL OBTENTION BY APPLICATION OF SELECTED WILD MICROBIAL LIPASES

Tipo de participación: Póster (PS2)

Congreso: VII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE BIOTECNÓLOGOS BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013

Lugar de celebración: SEVILLA

Fecha: 10-12/07/2013

5) Co-autores: Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique David; Luna, Carlos; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE GIRASOL EMPLEANDO ÓXIDO DE CALCIO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO.

Tipo de participación: Póster (P 102)

Congreso: SECAT 13: CATALIZADORES Y REACTORES ESTRUCTURADOS

Lugar de celebración: SEVILLA

Fecha: 26-28/06/2013

4) Co-autores: Luna, Carlos; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema; Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: RASTREO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS SILVESTRES CON LIPASAS EFICACES PARA OBTENER BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA.

Tipo de participación: Póster (P 114)

Congreso: SECAT 13: CATALIZADORES Y REACTORES ESTRUCTURADOS

Lugar de celebración: SEVILLA

Fecha: 26-28/06/2013

3) Co-autores: Calero, Juan; Luna, Diego; Sancho, Enrique; Luna, Carlos; Cumplido, Gema; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: SÍNTESIS DE UN NUEVO BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA EMPLEANDO ÓXIDO DE CALCIO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO.

Tipo de participación: Oral (O17-CFQ)

Congreso: IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES

Lugar de celebración: CORDOBA

Fecha: 7y8/02/2013

2) Co-autores: Cumplido, Gema; Luna, Diego; Sancho, Enrique David; Luna, Carlos; Calero, Juan; Posadillo, Alejandro; Bautista, Felipa María; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: OBTENCIÓN DE UN BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA EMPLEANDO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO KF SOPORTADO

Tipo de participación: Póster (P28-CFQ)

Congreso: IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES

Lugar de celebración: CORDOBA

Fecha: 7y8/02/2013

1) Co-autores: Luna, Carlos; Sancho, Enrique David; Luna, Diego; Calero, Juan; Cumplido, Gema; Bautista, Felipa María; Posadillo, Alejandro; Romero, Antonio Ángel; Verdugo, Cristóbal.

Título: OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LIPASAS SILVESTRES.

Tipo de participación: Oral (O18-CFQ)

Congreso: IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES

Lugar de celebración: CORDOBA

Fecha: 7y8/02/2013