

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Síntesis de biodiésel y caracterización de bebidas alcohólicas
mediante técnicas de elevada resolución**

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química bajo el
programa Técnicas Experimentales en Química

Vicente Sáez Montaner

Directores:

Dr. Ernesto Francisco Simó Alfonso

Dr. José Manuel Herrero Martínez

Dr. David Ortiz de Zárate Díaz

D. Ernesto Francisco Simó Alfonso y D. José Manuel Herrero Martínez, Catedrático y Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia y D. David Ortiz de Zárate Díaz, Investigador en el Centro de Tecnología Nanofotónica de la Universitat Politècnica de Valencia.

Certifican

Que la presente memoria, que lleva por título “*Síntesis de biodiésel y caracterización de bebidas alcohólicas mediante técnicas de elevada resolución*” constituye la Tesis Doctoral de D. Vicente Sáez Montaner.

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo como su redacción.

Y para que así conste a los efectos oportunos y a petición del interesado, firmamos la presente en Burjassot, a 27 de Octubre de 2015.

Ernesto Francisco
Simó Alfonso

José Manuel
Herrero Martínez

David Ortiz de
Zárate Díaz

Prof. Dr. Ernesto Francisco Simó Alfonso and Dr. José Manuel Herrero Martínez from the Department of Analytical Chemistry of the University of Valencia, and Dr. David Ortiz de Zárate Díaz Researcher at Nanophotonics Technology Center of the Polytechnic University of Valencia.

This is to certify that the present work entitled “*Síntesis de biodiésel y caracterización de bebidas alcohólicas mediante técnicas de elevada resolución*” constitutes the PhD thesis of Mr. Vicente Sáez Montaner.

The undersigned also certify that they have supervised all the aspects of the present work, including its writing.

In witness thereof, we signed the present document in Burjassot, 27th October 2015.

Ernesto Francisco
Simó Alfonso

José Manuel
Herrero Martínez

David Ortiz de
Zárate Díaz

Bullirà el mar com la cassola en forn

Ausiàs March

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo de un gran número de personas:

En primer lugar, quisiera agradecer a mis Directores, El Dr. Ernesto Francisco Simó Alfonso, al Dr. José Manuel Herrero Martínez y al Dr. David Ortiz de Zárate Díaz, por su ayuda, dedicación y todos los conocimientos que me han transmitido. Su confianza, apoyo y paciencia han sido fundamentales para poder llevar a cabo este proyecto.

Además, quisiera dar las gracias tanto a la Universidad de Valencia como a Integral Bioenergies Systems S.L. (IBS) por la beca predoctoral V Segles Empresa que me concedieron y la ayuda extra en las estancias realizadas en Brasil y en Italia.

También agradezco al Dr Octavio Valsechi y al *Departamento de Tecnología Agroindustrial e Sócio economia Rural* por su gran aporte en el campo de los biocombustibles y su hospitalidad en la *Universidade Federal de São Carlos*.

Me gustaría también agradecer al *Politécnico di Milano* la posibilidad de realizar allí una estancia de investigación y especialmente al grupo del Doctor Pier Giorgio Righetti por sus enseñanzas en el área de la proteómica y su buena acogida.

También agradecer a mis compañeros en IBS, ya que a pesar de un final amargo por la desaparición de la empresa, nadie podrá borrar tres grandes años donde crecí muchísimo tanto profesional como personalmente.

Por otro lado, no me puedo olvidar de mis compañeros del Laboratorio 10, Aarón, Ceci, Enrique, Isabel, las dos Marías, Miriam, Laura, y muchos otros, tanto del laboratorio 10 como del resto del departamento, por su gran acogida el año que compartí con ellos, un año de buenas conversaciones y mejores partidas al lobo en la cafetería.

Aunque estemos repartidos por todo el mundo, desde México al Rincón de Ademuz, por ser capaces de motivarme en los momentos en los que el objetivo final parecía muy lejano. Gracias a los Químicos & Cía.: Fran, Voro,

Javi, Fer, Sergio, Hegias, Miguel, Rober, Bea, Mar, Andrea, Carmina, Patri, y Lorena.

Y como no, agradecer a mis hermanos, el apoyo recibido, sobre todo en estos últimos dos duros meses y a mis padres que por fin tienen un Doctor en la familia.

Por último, agradecerle a Marce el apoyo y comprensión durante todos estos años, ella sabe bien lo que supone para mi poder haber finalizado con éxito esta Tesis, y sin duda sin ella no lo habría conseguido. Muchas gracias.

A todos vosotros, y a los que aunque no haya nombrado, pero que han sido partícipes de que todo haya llegado a buen fin, GRACIAS.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
C14:0	Ácido mirístico
C15:0	Ácido pentadecanoico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C17:0	Ácido heptadecanoico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 Cis	Ácido oleico
C18:1 Trans	Ácido eláídico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
C20:0	Ácido araquídico
C20:1	Ácido eicosaenoico
C20:5	Ácido eicosapentaenoico
C22:0	Ácido behénico
C22:1	Ácido erúcido
C22:6	Ácido docosahexaenoico
C24:0	Ácido lignocérico
C24:1	Ácido nervónico
CHAPS	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
CNMC	Comisión nacional de los mercados y la competencia
CPLLs	Biblioteca combinatorial de ligandos peptídicos (<i>Combinatorial Peptide Ligand Libraries</i>)
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado (<i>Continuous Stirred-Tank Reactor</i>)
CV	Coefficiente de variación
CE	Electroforesis capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
DG	Diglicéridos
DTT	Ditiotreitol

EU-28	28 estados miembros de la Unión Europea
FA	Ácido fórmico
FAEE	Ésteres etílicos de ácidos grasos (<i>Fatty Acid Ethyl Ester</i>)
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos (<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>)
FFA	Ácidos grasos libres (<i>Free Fatty Acid</i>)
FID	Detector de ionización de llama
FPLC	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
Gly	Glicerina
HAP	Proteínas de alta abundancia (<i>High Abundance Proteins</i>)
HO	Alto oleico (<i>High oleic</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IEC	Cromatografía de intercambio iónico (<i>Ion Exchange Chromatography</i>)
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina G
IgY	Inmunoglobulina de yema de huevo
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (<i>Immobilized-Metal Affinity Chromatography</i>)
Ktoe	Miles de toneladas de crudo equivalente
LAP	Proteínas de baja abundancia (<i>Low abundance</i>)
MAP	Proteínas de media abundancia (<i>Medium abundance proteins</i>)
MeOH	Metanol
MeOR	Metilésteres
MG	Monoglicéridos

MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
Mtoe	Millones de toneladas de crudo equivalente
PLC	Controlador lógico programable
rADN	Ácido desoxiribonucleico recombinante
PEG	Polietilenglicol
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados (<i>PolyUnsaturated Fatty Acids</i>)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RPLC	Cromatografía de fase inversa (<i>Reverse-Phase Liquid Chromatography</i>)
SCX	Cromatografía de intercambio catiónico (<i>Strong Cation Exchange Chromatography</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Triglicéridos
TRIS-HCL	Tris (hidroximetil) aminometano
2D-CE	Electroforesis capilar bidimensional

PREFACIO

En esta Tesis Doctoral se describe el desarrollo de procedimientos de síntesis de biodiésel y caracterización de bebidas alcohólicas mediante técnicas analíticas de elevada resolución. La puesta a punto de los procedimientos de síntesis de biodiésel y sus estudios de caracterización se realizó en el marco de la ayuda otorgada para la formación de personal investigador de carácter predoctoral en el marco del programa V Segles de la Universitat de València, en la modalidad V Segles-Empresa, y con una duración de 4 años, en la empresa Integral Bioenergies Systems S.L., en respuesta a la demanda de producción de biocombustibles basados en materias primas renovables y de bajo impacto ambiental que puedan reemplazar de manera efectiva al diésel convencional obtenido a partir de fuentes fósiles. Otro de los aspectos descritos en esta Tesis, y entroncando con una de las líneas actuales de investigación del grupo, es la caracterización de proteínas en diversos extractos vegetales (principalmente de alcachofa) y licores derivados de éstos con objeto de establecer su autenticidad mediante técnicas cromatográficas y electroforéticas.

De acuerdo a lo estipulado en la reglamentación de Tesis Doctorales de la Universidad de Valencia con mención internacional, parte de la Memoria está redactada en un idioma oficial de la Unión Europea distinto del castellano (Capítulos 4 y 6).

La presente Memoria se divide en cuatro grandes bloques. El primer bloque, integrado por los Capítulos 1 y 2, contiene una introducción general, donde se describen generalidades de biodiésel, las técnicas de síntesis utilizadas en su producción, con especial énfasis en la tecnología supercrítica con metanol, así como las metodologías analíticas de caracterización habituales de este biocombustible. Por su parte, en el Capítulo 2 se describen las bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos (CPLLs), las cuales se aplicarán para el estudio de proteínas de baja concentración presentes en extractos vegetales y licores derivados de éstos.

El segundo bloque está dedicado al estudio de la producción de biodiésel a partir de diversas materias primas (derivadas o no de plantas oleaginosas)

utilizando metanol en condiciones supercríticas. Así pues, en el Capítulo 3, se describe el diseño de un reactor discontinuo para la obtención de biodiésel a partir de aceite de girasol utilizando dicha tecnología supercrítica, y evaluándose sus prestaciones frente a los procedimientos tradicionales de síntesis (transesterificación catalítica). En el Capítulo 4, se lleva a cabo un estudio de estabilidad térmica (cis-trans isomerización) de los principales ésteres metílicos insaturados generados durante la síntesis de biodiésel con metanol supercrítico a diversos tiempos de reacción y temperaturas. Por su parte, en el Capítulo 5, se describe la producción de biodiésel de segunda generación a partir de materias primas de diversa índole (grasas de origen animal, algas, aceite de pescado, entre otras) utilizando la tecnología supercrítica anteriormente descrita, y su utilización como alternativas económicamente competitivas frente a los aceites de plantas oleaginosas.

Por su parte, el tercer bloque, integrado por el Capítulo 6 está dedicado a la caracterización del proteoma de la alcachofa (*Cynara scolynus*) mediante CPLs, y su potencial aplicación para la evaluación de la autenticidad de licores producidos a partir de este vegetal. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Pier Giorgio Righetti del Departamento de Química, Materiales e Ingeniería Química “*Giulio Natta*” de la Universidad Politécnica de Milán (Italia).

Finalmente, en el último bloque se muestran las conclusiones más relevantes obtenidas de los dos bloques anteriores.

ÍNDICE

BLOQUE I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. Biocombustibles y biodiésel	3
1.1. Biocombustibles.....	5
1.2. Biodiésel.....	6
1.2.1. Marco legal del biodiésel en Europa.....	8
1.2.2. Plan de acción nacional de energías renovables de España 2011-2020.....	9
1.2.3. Panorama actual del biodiésel en Europa.....	10
1.3. Síntesis de biodiésel.....	14
1.3.1. Efecto de los parámetros de reacción en la producción de biodiésel.....	17
1.3.1.1. FFA y humedad.....	17
1.3.1.2. Temperatura y tiempo.....	17
1.3.1.3. Relación molar alcohol:aceite.....	18
1.3.1.4. Catálisis.....	18
1.3.1.5. Catálisis básica.....	18
1.3.1.6. Catálisis ácida.....	20
1.3.1.7. Catálisis enzimática.....	21
1.3.2. Síntesis de biodiésel en condiciones supercríticas.....	21
1.4. Procesos de producción del biodiésel.....	23
1.4.1. Proceso discontinuo (batch).....	23
1.4.2. Proceso en continuo.....	23
1.5. Evaluación de la calidad del biodiésel.....	24
1.5.1. Estándares de calidad.....	24
1.5.2. Propiedades del biodiésel y métodos evaluativos.....	28
1.6. Biodiésel de 2ª generación.....	29
1.6.1. Especies vegetales no alimenticias.....	30
1.6.2. Aceites de fritura usados.....	30
1.6.3. Grasas animales.....	31

1.6.4.	Microalgas.....	31
1.7.	Referencias.....	33
CAPÍTULO 2. Caracterización de licores con CPLLs		37
2.1.	Antecedentes y estado actual de la proteómica.....	39
2.2.	Limitaciones en separaciones proteómicas	40
2.3.	Determinación de proteínas de baja abundancia	40
2.4.	Métodos de sustracción y enriquecimiento de LAPs en proteómica.....	41
2.5.	Uso de las bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos (CPLLs).....	42
2.6.	Las CPLLs y el análisis del proteoma.....	43
2.7.	Referencias.....	44
BLOQUE II. SÍNTESIS DE BIODIÉSEL MEDIANTE EL USO DE MeOH SUPERCRÍTICO		47
CAPÍTULO 3. Producción de biodiésel en un reactor discontinuo usando condiciones supercríticas.....		49
3.1.	Introducción	52
3.2.	Experimental	54
3.2.1.	Reactivos y muestras.....	54
3.2.2.	Descripción del reactor de trabajo.....	54
3.2.3.	Producción de biodiésel en condiciones supercríticas.....	59
3.2.4.	Producción de biodiésel mediante catálisis homogénea.....	59
3.2.5.	Efecto del contenido de FFA sobre el rendimiento de la transesterificación de biodiésel	60
3.2.6.	Metodologías analíticas.....	61
3.3.	Resultados y discusión	62
3.3.1.	Estudio de la reproducibilidad del reactor.....	62
3.3.2.	Optimización de las condiciones de reacción.....	64
3.3.3.	Evaluación del contenido de FFA en la producción de biodiésel. Comparación con catálisis química homogénea	68
3.4.	Conclusiones	70

3.5. Referencias	71
CHAPTER 4. Evaluation of thermal stability and cis-trans isomerization of FAMEs in supercritical methanol	73
4.1. Introduction	76
4.2. Experimental	79
4.2.1. Reagents and Samples	79
4.2.2. Experimental method	80
4.2.3. Analytical methods.....	81
4.3. Results and discussion.....	81
4.3.1. Influence of reaction time on biodiesel thermal stability	81
4.3.2. Influence of reaction temperature on biodiesel thermal stability	83
4.3.3. Comparison of FAME production from different feedstock ..	92
4.4. Conclusions	93
4.5. References	94
CAPÍTULO 5. Síntesis de biodiésel de segunda generación a través del uso de MeOH supercrítico.....	95
5.1. Introducción	98
5.2. Experimental	100
5.2.1. Reactivos y materias primas.....	100
5.2.2. Descripción del reactor y condiciones utilizadas para la producción de biodiésel.....	101
5.3. Resultados y discusión	104
5.3.1. Producción de biodiésel de 2ª generación a partir de materias primas residuales con amplio intervalo de acidez	104
5.3.2. Síntesis de biodiésel de segunda generación a partir de materias primas con alto contenido en PUFAs	105
5.3.2.1. Transesterificación directa de algas mediante MeOH supercrítico	105
5.3.2.2. Transesterificación de aceite de pescado.....	107
5.4. Conclusiones	109
5.5. Referencias	110

BLOQUE III. CARACTERIZACIÓN DE DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS MEDIANTE TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ELEVADA RESOLUCIÓN	113
CHAPTER 6. Artichoke and Cynar liqueur: two (not quite) entangled proteomes	115
6.1. Introduction	118
6.2. Materials and methods	120
6.2.1. Chemical and biologicals	120
6.2.2. Plant materials and protein extraction protocols	120
6.2.3. ProteoMiner treatment.....	121
6.2.4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	122
6.2.5. Mass spectrometry and data analysis	122
6.3. Results	123
6.4. Discussion	129
6.4.1. On the artichoke proteome	129
6.4.2. On the Cynar proteome	133
6.5. Conclusions	136
6.6. References	137
BLOQUE IV. CONCLUSIONES FINALES	141

BLOQUE I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1.

Biocombustibles y biodiésel

1.1. Biocombustibles

En la actualidad, el 80% de la energía consumida es suministrada por los combustibles fósiles. El principal consumo (58%) se puede atribuir a los medios de transporte [1]. A pesar de ello, debido a que son la principal fuente de gases de efecto invernadero y al agotamiento de las reservas de petróleo, se hace necesario desarrollar alternativas capaces de generar energía y que sean sostenibles desde un punto de vista medioambiental.

Los biocombustibles han sido una fuente de energía que el ser humano ha usado desde tiempos ancestrales [2]. De hecho, los biocombustibles se han considerado seriamente desde la crisis energética de 1970, estudiándose en profundidad y empezando a usarse cada vez más como sustitutos de los combustibles tradicionales, altamente contaminantes [3]. Además potencian la independencia energética del país frente a los países productores de petróleo, ofrecen nuevas posibilidades de trabajo y tienen más en cuenta los criterios de desarrollo sostenible [4].

Los biocombustibles se pueden definir como combustibles líquidos en condiciones normales de presión y temperatura, formados por mezcla de compuestos orgánicos procedentes de biomasa (materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía), ya sea directamente o a través de algún tratamiento químico. Tanto por número de toneladas fabricadas como por cantidad de combustible consumido, los biocombustibles de mayor impacto son el bioetanol y el biodiésel.

El bioetanol, se obtiene a partir de la fermentación de los azúcares que contienen diferentes materias primas vegetales como pueden ser: materias azucaradas [5] (remolacha y caña de azúcar), materias procedentes de cereales [6] (maíz o soja) o materias celulósicas [7]. Constituye el 19,1 % del total de biocombustibles consumidos en medios de transporte en la Unión Europea [8].

El biodiésel es un conjunto de metilésteres de ácidos grasos, (FAMEs, *Fatty Acid Methyl Ester*) formados a partir de la transesterificación de aceites vegetales tales como palma, soja o girasol con metanol (MeOH). Constituye el 79,7 % del total de biocombustible de transporte consumido en la Unión Europea [8].

El uso de dichos biocombustibles en vehículos sigue las directrices de reducción de gases de tipo efecto invernadero, establecidas en el Protocolo de Kioto [9]. No obstante hay cierta controversia acerca del impacto global de los biocombustibles, ya que se han destinado recursos alimenticios (por ejemplo, el maíz) o tierras dedicadas al cultivo de alimentos con objeto de fabricación de biocombustibles, por lo que un macrocultivo de plantas oleaginosas para producir biodiésel puede tener un gran impacto ecológico y social [10]. No obstante, se están desarrollando numerosas investigaciones a nivel mundial para ofrecer soluciones a estos problemas.

Los biocombustibles de segunda generación se obtienen a partir de materias primas que no tienen uso alimentario (especies arbóreas perennes como la mamona (ricino) y el tempate (jatropha) utilizando tecnologías convencionales para su producción. También se incluye en esta categoría el biodiésel elaborado a partir de algas. El uso de biocombustibles de segunda generación, elimina la competencia alimento/combustibles y está orientado al aprovechamiento de suelos yermos o suelos no aptos para el cultivo de alimentos [11].

Los biocombustibles de tercera generación son aquellos que se han obtenido a partir de cultivos bioenergéticos específicamente diseñados mediante procedimientos biotecnológicos con el objetivo de incrementar la eficiencia de conversión de biomasa en energía.

1.2. Biodiésel

Entre todos los biocombustibles, destaca el biodiésel, que además de usarse para la simple generación de energía, puede sustituir al petrodiesel en los automóviles gracias a la semejanza de propiedades físicas. El biodiésel

está formado por FAMEs, obtenidos a partir de aceites y grasas. Entre las ventajas que ofrece este biocombustible se encuentran [12]:

- Es un combustible renovable, limpio y biodegradable.
- Tiene propiedades lubricantes debido a su contenido en oxígeno, por lo que su uso puede extender la vida útil de los automóviles [13].
- Crea un mercado para los residuos ácidos de aceites y grasas.
- Reduce la dependencia del petróleo importado.
- Presenta pocos compuestos sulfurados, lo cual reduce la contribución por azufre a la lluvia ácida.
- Reduce la emisión de hidrocarburos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), dióxido de carbono, monóxido de carbono, dióxido de azufre así como reducción de la emisión de partículas [14-18].

En la Tabla 1.1, a modo de ejemplo se comparan las propiedades de un aceite de palma con su respectivo biodiésel y un diesel de petróleo.

Tabla 1.1. Comparación de propiedades físico-químicas de un aceite de palma, el biodiésel derivado de éste, y diésel [19,20].

Propiedad	Aceite de palma	Biodiésel de palma	Diésel
Densidad a 15°C (Kg/m ³)	918	871,6	589,3
Viscosidad a 40°C (mm ² /s)	39,6	4,73	4,33
Punto de nube (°C)	-	16	-3
Número de cetano	42,0	62	46
% Residuo carbonoso	-	0,02-0,22	0,15
% Azufre	0,02	0,04	0,29
Punto de ignición (°C)	267	155-174	60

Desde el punto de vista ambiental, la reducción de gases de emisión contaminantes es todo un éxito y un paso adelante del biodiésel hacia la sustitución del petrodiesel y otras fuentes de energía convencionales. A pesar de ello aún hay cierta controversia con los datos de emisión de óxidos de nitrógeno (NO_x). Algunos autores aseguran que su emisión se mantiene o

aumenta ligeramente [14, 15, 21], mientras que otros afirman que se reduce [11, 17, 18, 22].

1.2.1. Marco legal del biodiésel en Europa

A continuación se muestra una serie de directivas europeas relacionadas:

- **Directiva 2003/17/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de marzo de 2003, por la que se modifica la Directiva 98/70/CE relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo incorporando la limitación del contenido de azufre máximo para gasolinas y gasóleo de automoción (clase A).
- **Directiva 2003/30/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de mayo de 2003, relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte. Esta Directiva tiene por objeto fomentar la utilización de biocarburantes u otros combustibles renovables como sustitutivos del gasóleo o la gasolina a efectos de transporte en los estados miembros, con el fin de contribuir a objetivos como el cumplimiento de los compromisos asumidos en materia de cambio climático, la seguridad de abastecimiento en condiciones ecológicamente racionales y la promoción de las fuentes de energía renovables. Establece el objetivo de que los biocarburantes alcancen una cuota de mercado sobre los carburantes utilizados en el sector del transporte del 5,75% (en unidades equivalentes de petróleo) para el año 2010.
- **Directiva 2003/96/CE** del Consejo, de 27 de octubre de 2003, por la que se reestructura el régimen comunitario de imposición de los productos energéticos y de la electricidad. Recoge la posibilidad de aplicar reducciones o exenciones fiscales al consumo de biocarburantes.
- **Directiva 2009/28/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009 relativa al fomento del uso de la energía procedente

de fuentes renovables. Fija como objetivos generales conseguir una cuota de mercado del 20% de energía procedente de fuentes renovables en el consumo de energía en el sector del transporte en cada estado miembro para el año 2020.

1.2.2. Plan de acción nacional de energías renovables de España 2011-2020

En el ámbito de la Unión Europea, cada vez ha sido más evidente la necesidad de un avance coordinado en la liberalización de los mercados, en la garantía del suministro, el desarrollo de las infraestructuras de interconexión y la reducción de emisiones contaminantes, entre otras materias. La política energética en España ha avanzado a lo largo de estos ejes comunes de manera armonizada con los países europeos, pero al mismo tiempo se ha singularizado para dar respuesta a los principales retos que han caracterizado tradicionalmente el sector energético español y que, de manera resumida, pueden sintetizarse en los siguientes:

- Un consumo energético por unidad de producto interior bruto más elevado. Para producir una misma unidad de producto interior bruto, España consume más energía que la media de los países europeos, incluso en comparación con aquellos dotados con una estructura industrial y productiva y de un grado de desarrollo económico similar. Ésta es una situación irreversible, sino del efecto de la acumulación de patrones de crecimiento económico muy intensivos en el consumo de energía. Para corregir esta tendencia, durante los últimos años, se han realizado importantes esfuerzos en materia de ahorro y eficiencia energética, que han permitido iniciar el camino hacia la convergencia con los valores medios europeos en intensidad energética.
- Elevada dependencia energética. La escasa presencia de yacimientos de energía primaria fósil ha supuesto históricamente una elevada tasa de dependencia energética en España. Esta mayor dependencia

introduce fuentes de riesgo adicionales sobre los procesos productivos, como los relacionados con la garantía del suministro energético o con la volatilidad de los precios de los mercados internacionales.

- Elevadas emisiones de gases de efecto invernadero, explicadas fundamentalmente por el fuerte crecimiento de la generación eléctrica y de la demanda de transporte durante las últimas décadas [23].

1.2.3. Panorama actual del biodiésel en Europa

La producción mundial de biodiésel en 2013 fue de 27,06 millones de toneladas y se estima que en 2014 fue de 29,12 millones de toneladas, lo que se traduce en un incremento de un 7,6%. Estados Unidos (EUA) es el mayor productor seguido por Indonesia, Brasil, Alemania y Argentina, si bien el conjunto de la Unión Europea dobla la producción de EUA.

El consumo en Europa ha ido ascendiendo a una gran velocidad en la última década, alcanzando su valor máximo en 2012. En la Figura 1.1, se puede observar que en 2013 hubo un retroceso importante en el consumo de biocombustible (destinado a transporte) y es debido en gran parte al descenso ocurrido en España. Como se observa en la Tabla 1.1, el consumo de biodiésel cayó en España un 57% durante el año 2013.

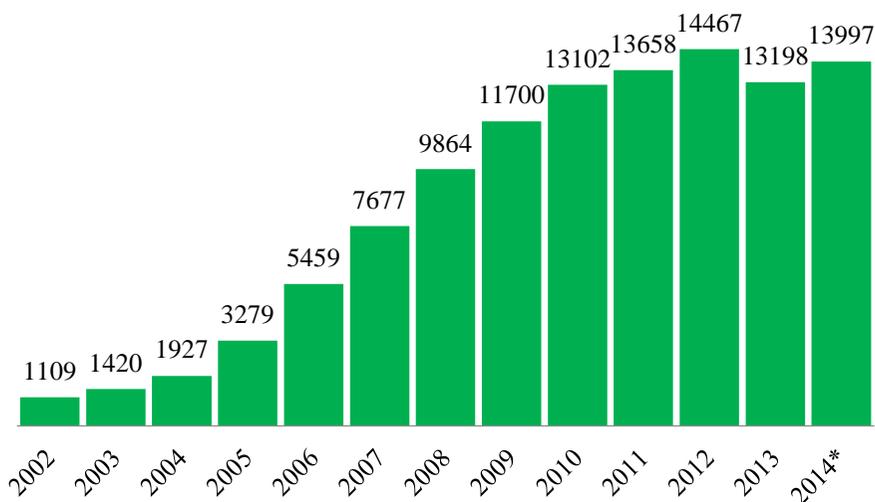


Fig. 1.1. Evolución del consumo de biocombustibles en la zona EU-28 [8] expresados en Kilotoneladas equivalentes de petróleo.

El descenso del consumo de biocombustibles en España es consecuencia directa de la rebaja de los objetivos obligatorios decretados por el gobierno español para 2013. El objetivo global de biocombustibles en gasóleo se redujo del 7 al 4,1%.

Tabla 1.1. Variación interanual del consumo de biocombustibles en los 5 países que más consumen en el EU-28 [24].

Ranking	País	2013	2012	Variación interanual (%)
1	Francia	2.293.324	2.268.977	1
2	Alemania	1.954.811	2.190.767	-10
3	Italia	1.169.175	1.263.288	-7
4	España	816.461	1.899.294	-57
5	Reino Unido	603.755	497.349	18

La tonelada de biodiésel durante los últimos 5 años tiene un sobrecoste respecto al diésel de entre un 100 y un 200 % (Figura 1.2) por lo que, en cuanto los gobiernos rebajan las cuotas o disminuyen su compromiso medioambiental, el consumo se resiente.

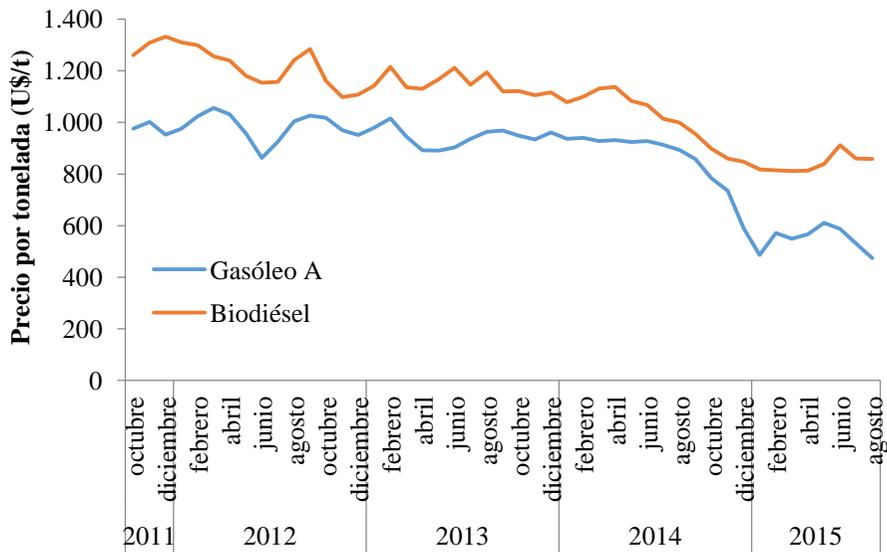


Fig. 1.2. Cotizaciones internacionales del precio (US\$) de la tonelada de gasóleo A y de biodiésel [25].

Otra muestra de la importancia del sistema regulatorio internacional en el área del biodiésel es la relación entre la producción/importación/exportación (Figura 1.3). Tal y como se observa, se produce el descenso de las importaciones debido a las medidas contra la competencia desleal tomadas por la Unión Europea para las importaciones de biodiésel originario de Argentina e Indonesia por estar perjudicando gravemente a los productos europeos.

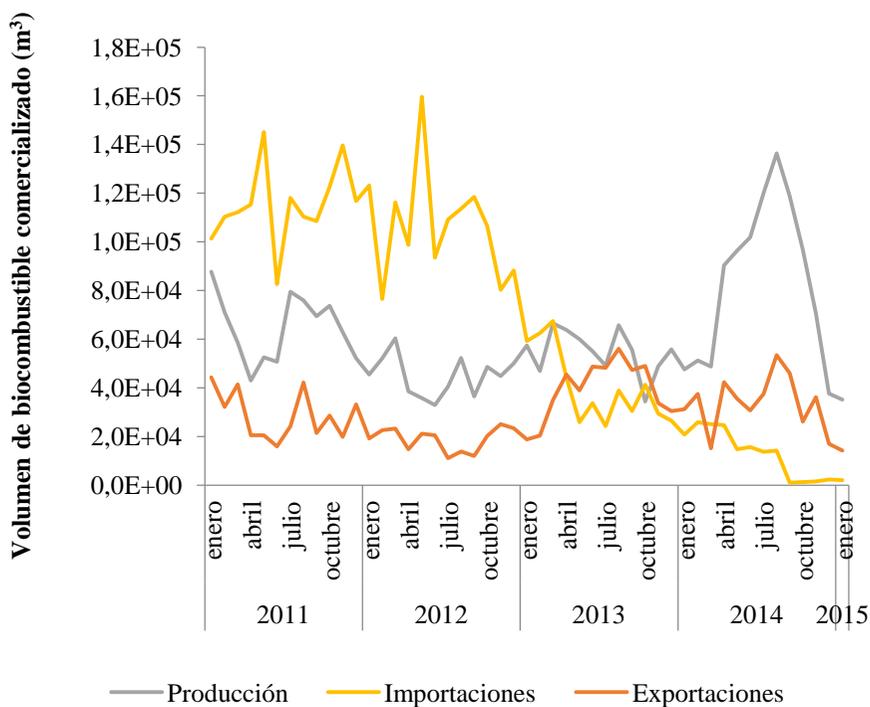


Fig. 1.3. Balance de producción/importación/exportación de biodiésel [25].

Para finalizar con el estado político-económico del biodiésel, en la Figura 1.4 se muestra la supremacía del consumo de biodiésel frente al del resto de los biocombustibles en Europa.

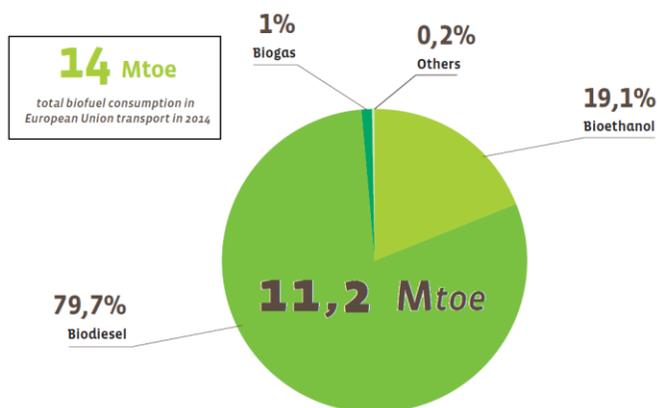


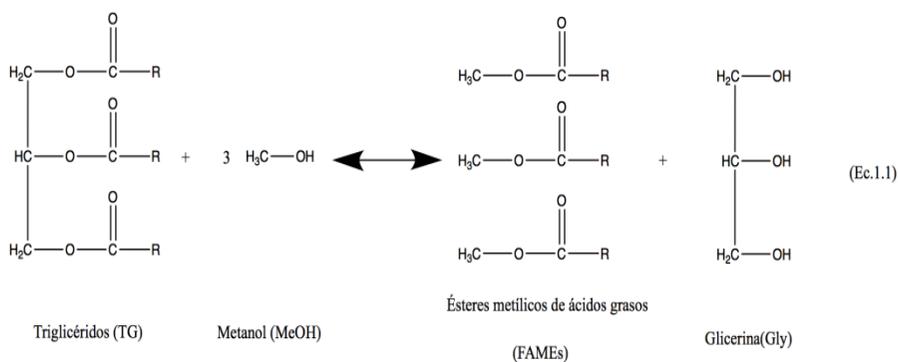
Fig. 1.4. Consumo de diferentes tipos de biocombustibles en 2014 en EU-28 expresado en millones de toneladas equivalentes de petróleo (Mtoe).

1.3. Síntesis de biodiésel

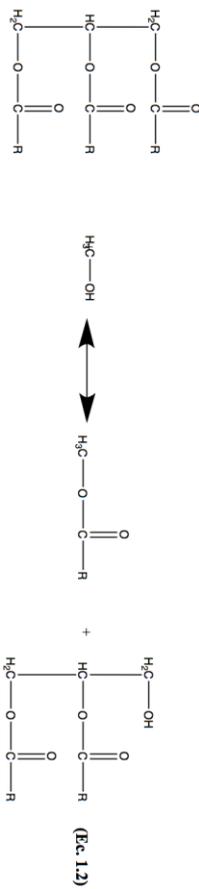
Cualquier tipo de aceite o grasa está compuesto por glicéridos (monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG)), y por un porcentaje de ácidos grasos libres (FFAs, *Free fatty acids*).

En la reacción de transesterificación, los TG reaccionan con un alcohol generalmente etanol (EtOH) o MeOH, produciendo ésteres (FAMES) y glicerina (Gly), tal y como se muestra la ecuación 1.1.

Transesterificación los TG:



El proceso global realmente implica una secuencia de tres reacciones reversibles consecutivas (ecuaciones 1.2 a 1.4).

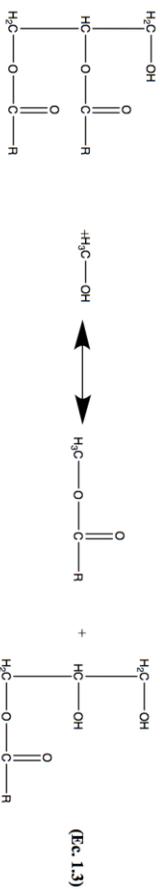


Triglicérido (TG)

Metanol (MeOH)

Éster metílico de ácidos grasos (FAME)

Diglicérido (DG)

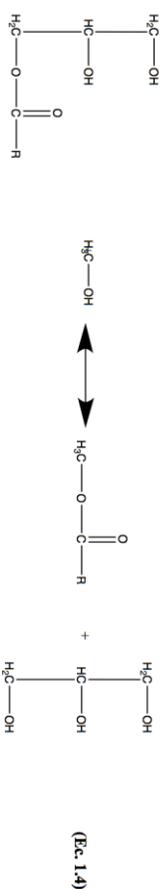


Diglicérido (DG)

Metanol (MeOH)

Éster metílico de ácidos grasos (FAME)

Monoglicérido (MG)



Monoglicérido (MG)

Metanol (MeOH)

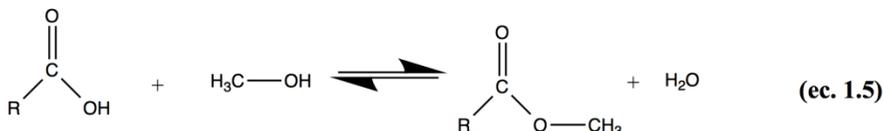
Éster metílico de ácidos grasos (FAME)

Glicerina (Gly)

En el primer paso, de los TG se obtiene el DG, y a continuación, del DG se produce el MG, y de éste, en el último paso, se obtiene la Gly.

También los FFA (R-COOH) pueden reaccionar con MeOH para formar biodiésel (MeOR) mediante la siguiente reacción:

Esterificación de los ácidos Grasos:



Estas reacciones tienen una cinética particular y son muy lentas a temperatura y presión ambiente. Como consecuencia la industria tiene que intervenir para acelerarlas modificando las condiciones de síntesis o usando catalizadores [26]. Un exceso del alcohol para desplazar la reacción hacia la formación de metil ésteres, catálisis homogénea (tanto ácida como básica), o el uso de cosolventes y lipasas son algunas estrategias para acelerar esas reacciones [27].

La catálisis ácida, favorece la esterificación de FFA de forma eficaz pero la separación del catalizador del biodiésel es bastante complicada y la reacción se ve afectada por el contenido en agua [28]. Por el contrario, la catálisis básica favorece la transesterificación de los glicéridos, pero conlleva la saponificación de los ácidos grasos reduciendo así los reactivos disponibles y haciendo complicada la separación de la Gly debido a las propiedades surfactantes de los jabones [29-30]. Los cosolventes mejoran la reacción facilitando la solubilidad entre el MeOH y el aceite, aunque generan residuos y el uso de enzimas es a día de hoy inviable económicamente [27].

El biodiésel también se puede obtener a partir de una ruta no catalítica mediante el empleo de elevada presión y temperatura [31]. El MeOH en el estado supercrítico (condiciones de presión y temperatura por encima del punto crítico del MeOH) presenta dos ventajas evidentes:

- Aumento de la energía cinética
- Menor constante dieléctrica lo cual facilita la solubilidad de los reactivos [32].

La consecuencia directa es que los FFA, glicéridos y MeOH se encuentran en la misma fase, permitiendo así, que las reacciones de esterificación y transesterificación transcurran simultáneamente. Además dichas reacciones transcurren en todo el volumen de reacción, no sólo en la interfase. Esto permite prescindir de catalizadores homogéneos por lo que se facilita el tratamiento posterior del biodiésel (separación de Gly). Este proceso se conoce como “*Saka process*” [31].

1.3.1. Efecto de los parámetros de reacción en la producción de biodiésel

A continuación, se describen los parámetros más relevantes en el proceso de obtención de biodiésel.

1.3.1.1. FFA y humedad

La humedad y el contenido en FFA son parámetros clave para determinar la viabilidad del proceso de transesterificación de un aceite vegetal [27]. La presencia de FFA y agua tiene un efecto negativo para la conversión en FAMEs ya que su presencia genera jabones, interaccionan con el catalizador y por tanto reducen su efectividad conduciendo a un descenso de la conversión [33]. Además la presencia de FFA dificulta la separación posterior de la Gly, por lo cual debe mantenerse por debajo de un 3% para llevar a cabo una reacción de transesterificación satisfactoria [27].

1.3.1.2. Temperatura y tiempo

La temperatura influye claramente en la reacción de transesterificación y en el rendimiento del producto biodiésel. También, depende del tipo de aceite a transesterificar [34-36]. Una temperatura elevada, puede disminuir la

viscosidad del aceite, produciendo un aumento de la velocidad de reacción y una disminución del tiempo de reacción. Sin embargo, algunos autores han demostrado que cuando la temperatura de la reacción aumenta por encima del nivel óptimo, la conversión en biodiésel disminuye porque a elevadas T° acelera la reacción de saponificación de los TGs. Habitualmente, la reacción de transesterificación es llevada a cabo en torno al punto de ebullición del alcohol, en el caso del MeOH, se suele aceptar 60°C y 6 horas de reacción.

1.3.1.3. Relación molar alcohol:aceite

La relación molar alcohol:aceite, es una de las variables más importantes que afectan al rendimiento de la reacción. A pesar que la relación molar estequiométrica es de 3:1 MeOH:TG, relaciones molares más altas son usadas para desplazar el equilibrio y asegurar la solubilidad, lo que permite aumentar el contacto entre TG y MeOH y reducir el tiempo de reacción. Por su parte, un aumento de la cantidad de MeOH lleva consigo un aumento de la energía necesaria en el proceso ya que después se debe eliminar el exceso de reacción, por lo que encarece el producto final. Para una conversión máxima se recomienda utilizar una relación molar 6:1, aunque esta relación dependerá del tipo de materia prima utilizada.

1.3.1.4. Catálisis

La reacción de transesterificación requiere la presencia de un catalizador para que pueda transcurrir a una velocidad adecuada. Los catalizadores pueden ser ácidos, básicos o enzimáticos. La reacción con catálisis básica es mucho más rápida que la ácida y es la usada a escala industrial.

1.3.1.5. Catálisis básica

Industrialmente, el proceso de transesterificación es catalizado por alcóxidos e hidróxidos.

El mecanismo de la reacción de transesterificación de aceites vegetales con catalizadores básicos se muestra en la Figura 1.5.

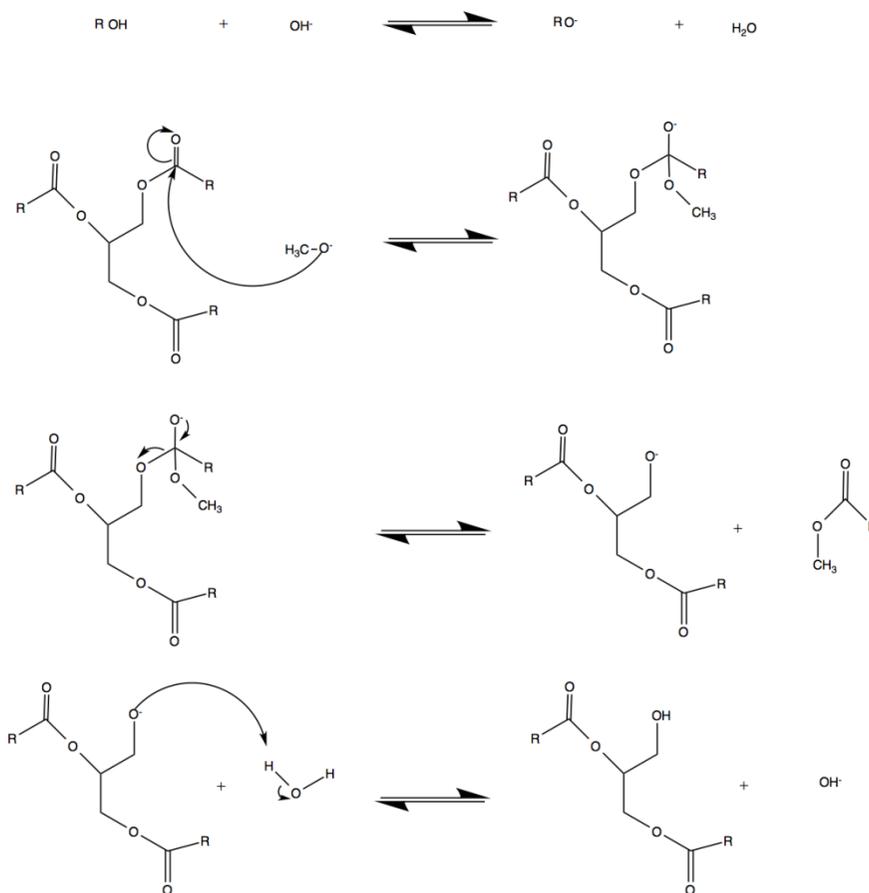


Fig. 1.5. Mecanismo de reacción de transesterificación con catálisis básica.

La etapa fundamental en la catálisis homogénea básica es la formación de un alcóxido nucleofílico a partir del alcohol. Una vez formado ataca la parte deficiente en electrones del grupo carbonilo, generándose, un intermedio tetraédrico. A partir de éste se forma el éster alquílico y un ión del diacilglicérido correspondiente, el cual termina protonándose y regenerando así el catalizador [37], siendo apta para reaccionar con una segunda molécula de alcohol, a partir de otro ciclo catalítico. DGs y MGs son convertidos por el mismo mecanismo a una mezcla de ésteres de alquilo y Gly.

1.3.1.6. Catálisis ácida

La reacción de transesterificación catalizada por un ácido de Brønsted, como sulfónico o sulfúrico, proporciona elevados rendimientos. Sin embargo, las reacciones son más lentas que con catalizadores básicos, requieren temperaturas superiores a 100°C y más de 3 horas para completar la reacción [38]. La relación molar alcohol:aceite juega un papel crítico ya que un aumento de la proporción de MeOH favorece la formación de productos, pero por otra parte una cantidad excesiva de MeOH, complica la recuperación de la Gly. El mecanismo de la reacción catalizada por ácido se muestra en la Figura 1.6.

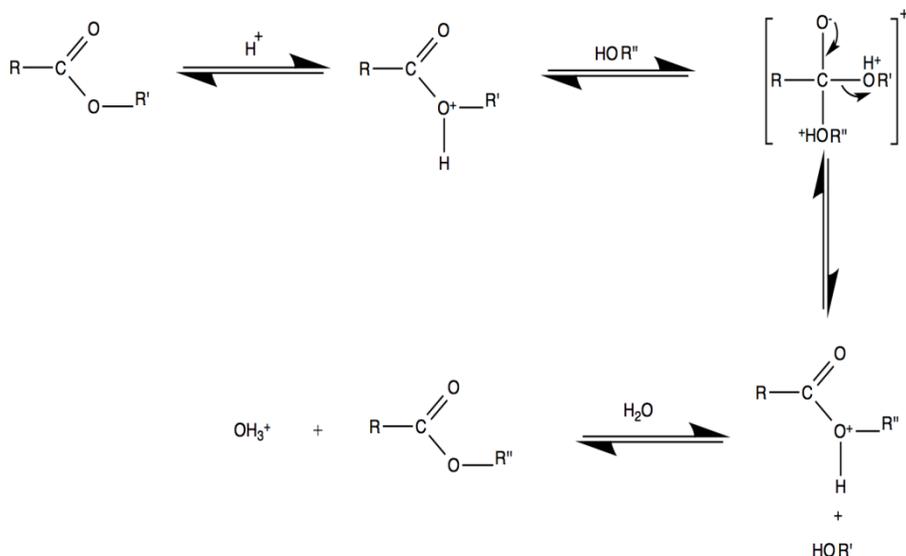


Fig. 1.6. Mecanismo de reacción de transesterificación con catálisis ácida.

El carbocatión formado sufre un ataque nucleofílico del alcohol originando un intermedio tetraédrico, a partir del cual se forma el éster alquílico, el DG correspondiente y se regenera la especie activa, a partir de otro ciclo catalítico. DGs y MGs son convertidos por el mismo mecanismo a una mezcla de ésteres de alquilo y Gly.

Los catalizadores ácidos, son insensibles a la presencia de FFAs en la materia prima, ya que pueden catalizar la transesterificación (Figura 1.6) y esterificación (Figura 1.7), al mismo tiempo.

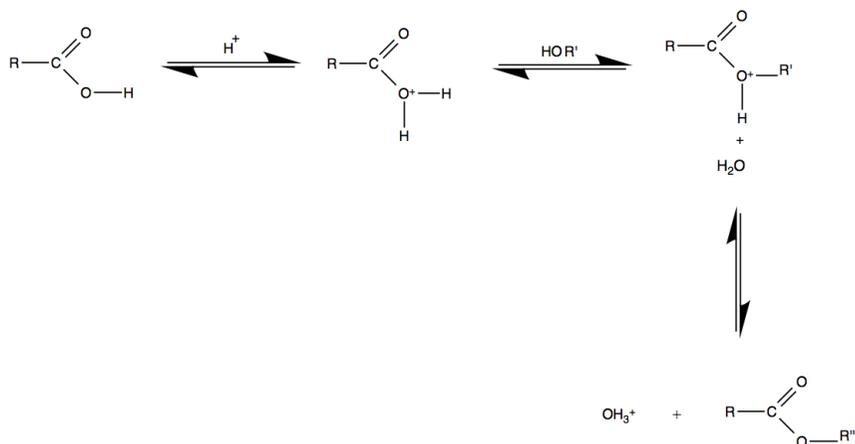


Fig. 1.7. Mecanismo de reacción de esterificación con catálisis ácida [39].

La catálisis ácida es más eficiente cuando la cantidad de FFAs en el aceite es superior al 1%.

1.3.1.7. Catálisis enzimática

Los catalizadores enzimáticos como las lipasas son capaces de catalizar la transesterificación de los TG [40]. Tienen la ventaja de ser reutilizables y hacer que el glicerol sea fácilmente eliminado, convierten los FFA en ésteres y no son inhibidas por la presencia de agua. Sin embargo, el MeOH o el glicerol pueden inactivar las enzimas al acumularse, pero su mayor inconveniente es que los costos de producción de las lipasas son mayores que los catalizadores alcalinos o ácidos [27, 41-43].

1.3.2. Síntesis de biodiésel en condiciones supercríticas

Tal y como se ha comentado la transesterificación de aceites de vegetales a biodiésel con MeOH, puede ser llevada a cabo utilizando distintos tipos de catálisis. Sin embargo, dichos procesos catalíticos están sujetos a limitaciones,

siendo de gran interés desde un punto de vista práctico, el desarrollo de procesos en los que no sea necesario emplear catalizador o, en el peor de los casos, emplear una cantidad mínima.

Saka y Kusdiana [31], propusieron la síntesis de biodiésel a partir de aceites vegetales, mediante un proceso no catalítico, en el que se utiliza alcohol en condiciones supercríticas.

La idea básica del tratamiento supercrítico es utilizar el cambio de propiedades termofísicas que experimenta el alcohol al someterlo a presiones y temperaturas críticas, para así favorecer la reacción de transesterificación. Estas propiedades son tales como, constante dieléctrica, viscosidad, y polaridad [44].

De manera que la transesterificación de TGs con un alcohol pasa de ser una reacción heterogénea (dos fases líquidas) a temperaturas convencionales de procesamiento a una fase homogénea en condiciones supercríticas. Este hecho acelera la reacción, porque no hay transferencia de masa en la interfase, para limitar la velocidad de reacción. Otro efecto positivo del uso de condiciones supercríticas es que el alcohol no es sólo un reactivo, sino también un catalizador ácido. El mecanismo de reacción de aceites vegetales con MeOH supercrítico fue descrito por los mismos autores [31].

La reacción de transesterificación empleando MeOH supercrítico, presenta todas estas ventajas:

- Los glicéridos y FFAs reaccionan con tasas equivalentes.
- La existencia de una fase homogénea elimina los problemas difusivos.
- El proceso tolera grandes porcentajes de agua en la materia prima
- Se elimina la etapa de separación del catalizador.
- Si se utilizan elevadas relaciones MeOH:aceite, la conversión total del aceite se puede lograr en unos pocos minutos.

A pesar de tener todas estas ventajas, el método de MeOH supercrítico, tiene algunas desventajas:

- El proceso opera a presiones muy altas (25-40 MPa) y a elevadas temperaturas (350-400°C), lo que conlleva altos costos, que pueden no ser viables en la industria.
- Elevadas relaciones MeOH:aceite (normalmente 42:1) implican un alto coste para la evaporación del MeOH que no ha reaccionado [45].

1.4. Procesos de producción del biodiésel

Las tecnologías existentes para transesterificar son relativamente simples, y pueden ser combinadas de diferentes maneras variando las condiciones del proceso y la alimentación del mismo. La elección de la tecnología dependerá de la capacidad deseada de producción, alimentación, calidad y recuperación del alcohol y del catalizador. En general, plantas de menor capacidad y diferente calidad en la alimentación (utilización al mismo tiempo de aceites refinados y reutilizados) suelen utilizar procesos discontinuos. Los procesos continuos, sin embargo, son más idóneos para plantas de mayor capacidad que justifique el mayor número de personal y requieren una alimentación más uniforme [32].

1.4.1. Proceso discontinuo (batch)

El proceso discontinuo es el método más simple para la producción de biodiésel. Sin embargo para obtener un biodiésel que cumpla con las normas existentes se requiere de tecnologías y condiciones apropiadas que pueden dificultar la producción a pequeña escala [46]. Este tipo de proceso se realiza en reactores tipo “batch” que están equipados con agitación y con un condensador de reflujo. Las condiciones de operación son establecidas previamente de acuerdo a la calidad de la materia prima.

1.4.2. Proceso en continuo

Una variación del proceso discontinuo es la utilización de reactores continuos del tipo tanque agitado (CSTR). Este tipo de reactores permite mayores tiempos de residencia y lograr aumentar los resultados de la reacción.

Así, tras la decantación de glicerol en el decantador, la reacción en un segundo CSTR es mucho más rápida. Un elemento esencial en el diseño de los reactores CSTR es asegurar que la mezcla se realiza convenientemente para que la composición en el reactor sea prácticamente constante. Esto tiene el efecto de aumentar la dispersión del glicerol en la fase éster [47].

Otra forma del proceso continuo es el reactor de tipo tubular. En este caso la mezcla de reacción se mueve longitudinalmente, los reactivos se mezclan en la dirección axial, y se aprovechan los flujos turbulentos inducidos por bombas, agitadores estáticos [48, 49] y ultrasonidos [50] para mezclar los reactivos. La agitación o el flujo turbulento causa la dispersión de pequeñas gotas de la fase oleosa en la metanólica. La agitación ultrasónica induce cavitaciones de gotas asimétricas para colapsar en la interfase alcohol-aceite, mezclando diminutas gotas de un líquido en el otro, lo cual aumenta la superficie de contacto.

El resultado es un sistema en continuo que requiere tiempos de residencia menores con el consiguiente ahorro energético. Este tipo de reactor puede operar a elevada temperatura y presión para aumentar el porcentaje de conversión. Se han descrito tiempos desde 15 minutos a 2 horas para reactores tubulares en régimen turbulento [49].

1.5. Evaluación de la calidad del biodiésel

1.5.1. Estándares de calidad

La calidad del biodiésel determina el funcionamiento y la vida útil de los equipos de inyección de combustible en los motores diésel, de igual manera determina el éxito en el mercado y la satisfacción o el rechazo de sus consumidores, principalmente a largo plazo.

La composición química del biodiésel y del diésel fósil es diferente, dando origen a propiedades similares o diferentes según el caso. El diésel no contiene oxígeno y contiene 30-35% de hidrocarburos aromáticos, 65-70% de parafinas y trazas de olefinas, teniendo componentes principalmente en el

rango de C10 a C16. El biodiésel contiene ácidos grasos de alquilésteres principalmente en el rango de C16 a C18, con un contenido de oxígeno del 11% p/p [20]. La calidad del biocombustible se puede evaluar en función de los parámetros básicos requeridos para el biodiésel por las normativas Europea EN 14214 y Americana ASTM D6751.

Tabla 1.3. Parámetros del biodiésel requeridos según la norma EN14214.

Propiedad	Unidad	Límites		Método de ensayo
		Mín	Máx	
Contenido en éster	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Densidad a 15°C	Kg/m ³	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidad a 40°C	mm ² /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Punto de inflamación	°C	120	-	EN ISO 3679
Contenido de azufre	mg/Kg	-	10,0	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Residuo de carbón (en 10% de residuo destilado)	% (m/m)	-	0,30	EN ISO 10370
Índice de cetano		51,0	-	EN ISO 5165
Contenido de cenizas sulfatadas	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Contenido en agua	mg/Kg	-	500	EN ISO 12937
Contaminación total	mg/Kg	-	24	EN 12662
Corrosión de la tira de cobre (3 h a 50°C)		Clase 1		EN ISO 2160
Estabilidad a la oxidación 110°C	Horas	6,0	-	EN 14112
Índice de acidez	mg KOH/g	-	0,50	EN 14104
Índice de yodo	g yodo/ 100g	-	120	EN 14111
Éster de metilo de ácido linolénico	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Ésteres de metilo poli-insaturados (≥ a 4 dobles enlaces)	% (m/m)	-	1	
Contenido en MeOH	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Contenido en MG	% (m/m)	-	0,80	EN 14105
Contenido en DG	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Contenido en TG	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Gly libre	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Gly total	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Metales del grupo 1 (Na + K)	mg/Kg	-	5,0	EN 14108 EN14109
Metales del grupo 2 (Ca + Mg)	mg/Kg	-	5,0	EN 14538
Contenido en fósforo	mg/Kg	-	10,0	EN 14107

Las normas estandarizadas son documentos aprobados y reconocidos por un grupo de expertos de cada país para asegurar la alta calidad del biodiésel, y se basan en una serie de parámetros físicos y químicos establecidos para medir sus propiedades. El cumplimiento de éstos es necesario para que el biodiésel pueda ser comercializado.

Existe una gran variedad de materias primas utilizadas en la producción de biodiésel, y el uso de unas u otras implica importantes diferencias en las propiedades del biodiésel obtenido. A nivel regional esta amplia gama de materias primas se reduce a aquellas que se encuentran con una mayor disponibilidad. De este modo, en los países europeos el biodiésel se produce principalmente a partir de aceite de colza, mientras que en los americanos se realiza con aceite de soja, excepto en las zonas tropicales y subtropicales de Centroamérica, donde se produce con aceite de palma al igual que en Indonesia y Malasia. Por esta razón cada país implementa sus propias normas debido a que copiar estándares extranjeros puede constituir una barrera, ya que en muchos casos estos estándares son diseñados con el objetivo de controlar el mercado en lugar de facilitar su implementación [51].

Las principales normas técnicas para biodiésel son la europea EN 14214 (*European Committee for Standardization, CEN,*) y la estadounidense ASTM D6751 (*American Standard Test Methods*). Además recientemente fue implementada la norma ASTM D7467 para regular la mezcla de biodiésel con diésel de 6 a 20% v/v (B6 a B20).

Por su parte la norma CEN EN 590 (Tabla 1.3), que regula la calidad de los gasóleos y mezclas de hasta el 5% de biodiésel, establece que todo biodiésel mezclado en diésel convencional debe cumplir con los estándares de la EN 14214.

Las diferencias entre ellas no sólo incluyen los estándares de calidad considerados y los valores límites aplicados a cada uno de ellos, sino también los métodos de medida, que aunque en muchos casos se tratan de técnicas similares, emplean procedimientos distintos que implican una difícil comparación entre los valores límite de los estándares.

Otra diferencia esencial entre las especificaciones técnicas europea y norteamericana es que la norma ASTM D6751 se aplica tanto a los FAMES como a los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE), mientras que la norma EN 14214 sólo es de aplicación para los primeros (FAME).

1.5.2. Propiedades del biodiésel y métodos evaluativos

Las propiedades del biodiésel dependen tanto del proceso de fabricación como de la naturaleza de los lípidos a partir de los cuales se ha producido. En las Tablas 1.4 y 1.5 se pueden observar algunas propiedades de los aceites más usados y las del biodiésel obtenido.

Tabla 1.4. Propiedades físico-químicas de aceites utilizados en la producción de biodiésel.

Tipo de aceite	Viscosidad (mm ² /s) ^a	Densidad (g/cm ³) ^b	Número cetano	Punto de nube (°C)	Índice de acidez (mg KOH /g _{muestra})	Índice de yodo (g I ₂ /100g)
Soja	33,1	0,914	36,1	-3,9	0,3-3,0	121-143
Colza	37,3	0,912	37,5	-3,9	>8,0	96-117
Girasol	34,4	0,916	36,7	7,2	0,6	127-142
Palma	39,6	0,918	42	-	6,9	55,57
Jatropha	36,8	0,916	-	-	10,1	-
Sebo	51,2	0,92	40,2	-	-	35-48

^a Viscosidad medida a 40°C.

^b Densidad medida a 21°C.

Tabla 1.5. Propiedades físico-químicas de biodiésel de diferente origen.

Tipo de biodiésel	Viscosidad (mm ² /s) ^a	Densidad (g/cm ³) ^b	Número cetano	Punto de nube (°C)	Flash point
Soja	3,1-4,1	0,884	45-54	-2	178
Colza	3,5-5,0	0,870-0,900	49-62	-2	155
Girasol	4,2-4,4	0,88	59,7	1	183
Palma	4,3-6,3	0,918	62	13	164
Jatrofa	3,5-5,0	0,881	50-58	4	164
Sebo	4,6-4,7	0,877	58	12-15	150
Aciete cocina usado	4,3-4,6	0,873	50-52	9	110-166

^a Viscosidad medida a 40°C.^b Densidad medida a 21°C.

1.6. Biodiésel de 2^a generación

El biodiésel de primera generación se obtiene principalmente de uno de los cuatro grandes cultivos de oleaginosas (colza, girasol, soja y palma). El uso de estos cultivos para la producción de biodiésel ha sido fuertemente cuestionado por algunos sectores, ya que para ello hacen un extensivo uso de la tierra, y de de irrigación, fertilización y control (herbicidas y plaguicidas), para acabar compitiendo así con el uso primario y de mayor necesidad social: el alimentario [10].

Además del problema social, el uso de estas plantas oleaginosas plantea otro problema adicional: su precio. De hecho, el precio del aceite representa un 75-85% del coste total del biodiésel. Sin embargo la demanda de la producción en todo el mundo ha crecido exponencialmente debido a las leyes gubernamentales, existentes en la mayoría de los países, que ordenan la utilización de un 10% de energías renovables desde el 2010 [52].

El biodiésel de segunda generación, parte de otras especies vegetales que pueden utilizarse como cultivos energéticos. Además de no competir con los alimentos, se caracterizan por su gran adaptabilidad climática, alto contenido de aceite, bajo contenido de FFA, compatibilidad con la estructura existen el campo, bajas necesidades agrícolas (fertilizantes, agua, pesticidas),

crecimiento definido por temporada, maduración uniforme de su cosecha, mercado potencial para los subproductos y la capacidad de crecer en tierras no deseables para la agricultura y/o fuera de temporada de los cultivos tradicionales [53].

1.6.1. Especies vegetales no alimenticias

Una gran variedad de plantas oleaginosas ha sido evaluada con el objetivo de encontrar una alternativa económicamente viable, que compita con los precios del petróleo y que además sea una solución sostenible que cumpla consideraciones técnicas, éticas, económicas y sociales para la producción de biodiésel. Algunas de ellas son: *Jatropha curcas* [10, 54], *Pongamia pinnata* [55], *Ricinus communis* (aceite de ricino, castor), *Cynara cardunculus* (cardo) [10,36], *Arachis hypogea L.* (aceite de maní) [57], *Eruca Sativa Gars* [58], *Madhuca indica* (aceite de mahua), *Azadirachta indica* (aceite de Neem), *Calophyllum inophyllum* (nagchampa/polanga oil), *Hevea brasiliensis* (aceite de semilla de caucho), entre otras [10,52,59].

1.6.2. Aceites de fritura usados

Los aceites residuales de cocina usados son generalmente, obtenidos de la industria de restaurantes o recogidos en lugares especialmente diseñados a tal efecto. Por ello, el coste puede ser nulo o bien un 60% menor que el de los aceites refinados, dependiendo de la fuente y la disponibilidad [60]. Los aceites usados presentan un gran nivel de reutilización, y muestran una buena aptitud para su aprovechamiento como biocombustible [13].

Las grasas animales y los aceites de cocina usados son conocidos como “grasas amarillas” si el contenido en FFA es inferior al 15% en masa, y “grasas oscuras o marrones” si su contenido de FFA es superior.

La utilización de aceites usados presenta dificultades logísticas y técnicas, no sólo por su recogida, sino también por su control y trazabilidad debido a su consideración como residuo. Otros problemas encontrados al utilizar aceites reciclados para producir biodiésel están relacionados con los

altos contenidos de material insaponificable, cantidad de agua y el alto contenido de FFA, por lo cual son imprescindibles varios procesos para acondicionar el aceite previamente a su transesterificación por medios convencionales. Finalmente, el producto suele presentar una baja estabilidad a la oxidación, por lo que no cumple la norma y requiere gran cantidad de agentes antioxidantes para solventar el problema, lo cual encarece el precio final del biodiésel.

1.6.3. Grasas animales

Esta materia prima incluye los subproductos (sebos) de una gran variedad de animales de granja tales como vacas, aves, cerdos y peces. Las grasas animales se caracterizan por tener un elevado contenido de ácidos grasos saturados lo cual puede ocasionar problemas en el biodiésel final. Por otro lado, éstas presentan un gran poder calorífico y un alto número de cetano [61].

Debido a su alta concentración de FFA, el tratamiento de éstas grasas por métodos de catálisis homogénea requiere una transesterificación en dos etapas. En primer lugar se lleva a cabo un pretratamiento con catálisis ácida (H_2SO_4) para esterificar los ácidos grasos, seguido de una transesterificación de los glicéridos con catálisis básica con una base fuerte (NaOH o KOH). Dependiendo de su origen, el biodiésel puede presentar problemas de estabilidad a la oxidación, lo que exige la adición de antioxidantes.

1.6.4. Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos, procariotas o eucariotas, que pueden crecer rápidamente y reproducirse en condiciones extremas debido a su simple estructura unicelular o multicelular. Ejemplos de microorganismos procariotas son las cianobacterias (*Cyanophyceae*), y de microalgas eucariotas son las algas verdes (*Chlorophyta*) y las diatomeas (*Bacillariophyta*).

Recientemente el potencial de las microalgas como fuente de desarrollo de energía sostenible ha sido extensamente revisado, convirtiendo a las

microalgas en centro de atención mundial ya que han llegado a ser propuestas para convertirse en la materia prima de las biorefinerías del futuro [62].

Las actuales limitaciones para extender la utilización de esta materia prima para la producción de biodiésel tienen que ver con la optimización de la recolección de las microalgas, el contenido en aceite, los procesos de extracción, y el suministro de CO₂ para una mejor eficiencia de la producción de microalgas. También la luz, los nutrientes, temperatura, turbulencias, niveles de CO₂ y O₂ necesitan ser ajustados cuidadosamente para proporcionar condiciones óptimas y de esta manera obtener los mejores rendimientos del contenido de aceite y biomasa [63]

Durante su ciclo vital, además de fijar CO₂, algunas familias de algas (como las *Chlorella*) pueden llegar a acumular bajo ciertas condiciones (como la privación de N₂) hasta un 70 % de su peso seco en forma de lípidos [64-65]. Así pues las algas y su aceite constituyen una materia prima no alimentaria, subproducto de otra industria, con potencial real para su revalorización por producción de biodiésel.

1.7. Referencias

- [1] Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yanez, E.E., Castillo, E.F., Almazan, O., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13 (2009) 1275.
- [2] Xiaohua, W., Zhenmin, F., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 8 (2004) 183.
- [3] Nwafor., O.M.I., *Renew. Energy* 29 (2004) 119.
- [4] Wierzbicka, A., Lillieblad, L., Pagels, J., Strand, M., Gudmundsson, A., Gharibi, A., *et al. Atmos. Environ.* 39 (2005) 139.
- [5] Muruaga, M. L., Carvalho, K. G., Domínguez, J. M., Pinheiro de Souza, R.O., Perotti, N., *Renew. Energ.* 85 (2016) 649.
- [6] Szymanowska-Powałowska, D., Lewandowicz, G., Kubiak, P.; Błaszczak, W., *Fuel* 119 (2014) 328.
- [7] Balat, M, *Energ. Convers. Manage.* 52 (2011) 858.
- [8] Biofuels barometer, July 2015, EurObserv'ER web site, (revisado 17 de octubre de 2015) <http://www.eurobserv-er.org/>
- [9] Protocolo de Kyoto de la convención marco de la ONU sobre cambio climático (revisado 17 de octubre de 2015) <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>
- [10] Pinzi, S., Garcia, I. L., Lopez-Gimenez, F. J., Luque de Castro, M.D., Dorado, G., Dorado, M.P., *Energy & Fuels* 23 (2009) 2325.
- [11] Van Ginneken, L., Meers, E., Guisson, R., Ruttens, A., Elst, K., Tack, F. M. G., Vangronsveld, J., Diels, L., Dejonghe, W., *J. Environ. Eng. Landsc.* 4 (2007) 227.
- [12] Pereira, R.G., Oliveira, C.D., Oliveira, J.L., Oliveira, P.C.P., Fellows, C.E., Piamba, O.E., *Renew. Energ.* 32 (2007) 2453
- [13] Agarwal, A.K., *Progr. Energ. Combust.* 33 (2007) 233.
- [14] Usta, N., *Energ. Convers. Manage.* 46 (2005) 2373.
- [15] Carraretto, C., Macor, A., Mirandola, A., Stoppato, A., Tonon, S., *Energy* 29 (2004) 2195.
- [16] Barnwal, B.K., Sharma, M. P., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 9 (2005) 363.

- [17] Kalligeros, S., Zannikos, F., Stournas, S., Lois, E., Anastopoulos, G., Teas, Ch., Sakellaropoulos, F., *Biomass Bioenerg.* 24 (2003) 141.
- [18] Puhan, S., Vedaraman, N., Ram, B.V.B. Sankarnarayanan, G. Jeychandran. K., *Biomass Bioenerg.* 28 (2005) 87.
- [19] Benjumea, P., Agudelo, J., Agudelo, A., *Fuel* 88 (2009) 725.
- [20] Mittelbach, M., Remschmidt, C. *Biodiesel - The comprehensive Handbook.* 1st ed. (2004) Graz: Mittelbach, M. P.
- [21] Ramadhas, A.S., Muraleedharan, C., Jayaraj, S., *Renew. Energ.* 30 (2005) 1789.
- [22] Lapuerta, M., Armas, O., Ballesteros, R., Fernández, J., *Fuel* 84 (2005) 773.
- [23] Plan de acción nacional de energías renovables de España (PANER) 2011 - 2020. Ministerio de Industria, Turismo y comercio, Gobierno de España.
- [24] Informe Sectorial 2015 Infinita Renovables (revisado 17 de octubre de 2015)
[http://www.infinita.eu/download.php?file=Informe%20biodiesel%20UE abril2015_AC_65.pdf](http://www.infinita.eu/download.php?file=Informe%20biodiesel%20UE%20abril2015_AC_65.pdf)
- [25] Estadísticas CNMC (revisado 17 de octubre de 2015)
<http://cnmc.es/LinkClick.aspx?fileticket=NCde225PIOY%3d&mid=2371&language=es-ES>
- [26] Ma, F., Hanna, M.A., *Bioresour. Technol.* 70 (1999) 1.
- [27] Meher, L.C., Sagar, D.V., Naik, S.N., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 10 (2006) 248.
- [28] Lotero E., *et al.*, *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (2005) 5353.
- [29] Pasiadis, S., Barakos, N., Alexopoulos, C., Papayannakos, N., *Chem. Eng. Technol.* 29 (2006) 1365.
- [30] Meher, L.C., Kulkarni, M.G., Dalai, A.K., Naik, S.N., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108 (2006) 389.
- [31] Saka, S., Kusdiana, D., Minami, E., *Fuel* 80 (2001) 225.
- [32] Saka, S., Kusdiana, D., Minami, E., *J. Sci. Ind. Res.* 65 (2006) 420.

- [33] Demirbas, A., Karslioglu, S., *Energy Sources Part A* 29 (2007) 133.
- [34] Marinetti, G.V. *J. Lipid Res.* 7 (1966) 786.
- [35] Graboski, M. S., McCormick, R. L., *Prog. Energ. Combust.* 24 (1998) 125.
- [36] Encinar, J.M., Gonzalez, J.F., Rodriguez, J.J., Tejedor, A., *Energy & Fuels* 16 (2002) 443.
- [37] Castellar, G., Angulo, E.R., Cardozo, B.M., *Prospect* 2 (2014) 90
- [38] Freedman, B., Pryde, E.H., Mounts, T.L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 1638.
- [39] Demirbas, A., *Energy Convers. Manage.* 49 (2008) 125
- [40] Helwani, Z., Othman, M.R., Aziz, N., Kim, J., Fernando, W.J.N., *Appl. Catal. A-Gen.* 363 (2009).1.
- [41] Mittelbach, M., Schober, S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80,(2003) 817.
- [42] Haas, M.J., *Fuel Process. Technol.* 86 (2005) 1087.
- [43] Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., *J. Biosci. Bioeng.* 92 (2001) 405.
- [44] Knothe, G., Steidley, K. R., *Fuel.* 86 (2007) 2560.
- [45] Enweremadu, C. C., Mbarawa, M. M., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13 (2009) 2205.
- [46] Girard, P., Fallot, A., *Energy Sustain. Dev.* 10 (2006) 92.
- [47] Leevijit, T., Tongurai, C., Prateepchaikul, G., Wisutmethangoon, W., *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 214.
- [48] Narvaez, P.C., Sanchez, F.J., Godoy-Silva, R.D., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (2009) 343.
- [49] Assmann, G., Blasey, G., Gutsche, B., Jeromin, L., Rigal, J., Armengaud, R., Cormary, B., (1996) Patente US5514820.
- [50] Stavarache, C., Vinatoru, M., Maeda, Y., Bandow, H., *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 413.
- [51] Castro, P., Coello, J., Castillo, L. *Opciones para la producción y uso del biodiesel en el Perú.*, 1 ed. *Soluciones Prácticas* (2007) 173.
- [52] Canakci, M., Sanli, H., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 431.
- [53] Moser, B., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 45 (2009) 229.

- [54] Lu, H., Liu, Y., Zhou, H., Yang, Y., Chen, M., Liang, B., *Comput. Chem. Eng.* 33 (2009) 1091.
- [55].Naik, M., Meher, L.C., Naik, S.N., Das, L.M. *Biomass Bioenerg.* 32 (2008) 354.
- [56] Da Silva, N.D., Maciel, M.R.W., Batistella, C.B., Filho, R.M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130 (2006) 405.
- [57] Kaya, C., Hamamci, C., Baysal, A., Akba, O., Erdogan, S., Saydut, A., *Renew. Energ.* 34 (2009) 1257.
- [58] Li, S., Wang, Y., Dong, S., Chen, Y., Cao, F., Chai, F., Wang, X., *Renew. Energ.* 34 (2009) 1871.
- [59] Singh, S.P., Singh, D., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14 (2010) 200.
- [60] Predojevic, Z.J., *Fuel* 87 (2008) 3522.
- [61] Mittelbach, M. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 227 (2004) 049.
- [62] Hariskos, I., Posten, C., *Biotechnol. J.* 9 (2014) 739
- [63] Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., *Chem. Eng. Process.* 48 (2009) 1146.
- [64] Griffiths, M.J., R.P. Van Hille & Harrison, S. T. L., *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 989.
- [65] Sharma, K.K., Schuhmann H., and Schenk M. P., *Energies* 5 (2012) 1532.

CAPÍTULO 2.

Caracterización de licores con CPLLs

2.1. Antecedentes y estado actual de la proteómica

En los últimos 10 años, se han producido avances significativos que han transformado la química de las proteínas en la ciencia de la proteómica. Estos avances han surgido gracias a una combinación, fruto de los desarrollos tecnológicos y conceptuales en técnicas de separación, en espectrometría de masas (MS) y en bioinformática. Aunque la mayor parte de los estudios proteómicos se han llevado a cabo tradicionalmente mediante separaciones 2D en gel, actualmente estas separaciones se realizan bajo la denominada proteómica de segunda generación o “*shotgun proteomics*” [1]. Esta técnica, basada en el acoplamiento de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un analizador de masas de trampa iónica o de tipo tiempo de vuelo es capaz de identificar millares de péptidos en un solo experimento, ya que permite analizar de forma automática los componentes de mezclas muy complejas de péptidos, como las producidas por ejemplo en la digestión directa de un proteoma. Posteriormente, los fragmentos peptídicos se comparan con bases de datos con el objeto de identificar y determinar las proteínas presentes en una muestra determinada [2].

Actualmente, los espectrómetros de masas poseen una excelente resolución, exactitud y precisión, pudiéndose determinar incluso concentraciones cercanas al femtomolar. Sin embargo, y concretamente para el análisis de proteínas, se está incrementando el uso de técnicas de fragmentación, ya que mediante su empleo es posible realizar diversas fragmentaciones de una misma proteína/péptido, obteniéndose así secuencias cortas que proporcionan una gran mejora en la exactitud y en la identificación de las proteínas en las bases de datos.

Por otro lado, y además de los avances proporcionados por la MS, son notables las contribuciones de la bioinformática para la identificación y clasificación de las proteínas, las cuales resultan fundamentales para el correcto procesamiento de los datos obtenidos [3-5].

2.2. Limitaciones en separaciones proteómicas

Los primeros resultados publicados dentro del campo de la proteómica empleaban métodos convencionales de análisis como herramientas de pre-fractionamiento previo al análisis por MS de proteínas o péptidos, con el fin de facilitar su determinación [6]. Las técnicas analíticas más utilizadas para este fin han sido la electroforesis capilar en una o dos dimensiones (CE o 2D-CE), el isoelectroenfoque (IEF), la cromatografía de intercambio iónico (IEC) y la cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC) [7]. Otras técnicas, tales como la cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) acoplada a una fase de intercambio catiónico fuerte (SCX), o acoplada a la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) o IEF, han sido también usadas con resultados satisfactorios [8]. Sin embargo, estos métodos no son capaces de reducir de manera efectiva la complejidad de la muestra proteómica ni de dar la resolución necesaria para la detección y determinación de las proteínas de baja abundancia (LAP) o “*hidden proteome*“ presentes en las muestras. Por ello, y con el fin de solucionar estas carencias, es prioritario el desarrollo de nuevos métodos de separación basados en técnicas de afinidad y de enriquecimiento.

2.3. Determinación de proteínas de baja abundancia

El principal obstáculo que se encuentra al analizar el proteoma de fluidos biológicos, tales como el plasma, es el amplio rango de concentración en el que se encuentran las proteínas, que comprende tanto proteínas de alta abundancia (HAP), presentes en las muestras en concentraciones del orden de mg/mL, como las LAP, que se encuentran en concentraciones del orden del pg/mL [9,10]. Dado que las HAPs constituyen más del 95% de la masa de proteínas plasmáticas totales, es necesario el empleo de herramientas y/o reactivos que sean capaces de separar específicamente las HAPs de las LAPs durante el pretratamiento de la muestra, con el fin de detectar las LAPs con una mayor sensibilidad y una mejor resolución. Por ello han surgido diversas

técnicas y metodologías capaces de eliminar o reducir las HAPs de muestras de suero o plasma [11]. Sin embargo, no se han desarrollado técnicas efectivas para el análisis del proteoma de extractos celulares, vegetales, etc [12-14].

2.4. Métodos de sustracción y enriquecimiento de LAPs en proteómica

Se han descrito diversas metodologías con el fin de reducir la complejidad del proteoma de una muestra, entre las que cabe destacar la reducción del rango de concentraciones en el que se encuentran las proteínas a estudiar, o la amplificación de la señal analítica de las LAPs. A continuación, se describen las diferentes metodologías adoptadas.

- *Métodos de sustracción:* Estas metodologías, se basan en la sustracción de las proteínas HAPs utilizando diferentes biomoléculas como anticuerpos, proteínas pre-péptidos y nucleótidos. Así por ejemplo, el proceso de preparación de muestra más eficaz para el análisis de proteínas de muestras de plasma, consiste en la separación de las mismas por técnicas de inmuno-afinidad, usándose para ello la inmunoglobulina G (IgG) o la inmunoglobulina de yema de huevo (IgY) [15]. Mediante este proceso, se consigue eliminar específicamente las HAPs reduciéndose así el rango de concentraciones. Por otro lado, también se han empleado otros métodos de sustracción, tales como el de las proteínas bacterianas A o G [16] o el uso de columnas de afinidad de Cibacron Blue [17]. Sin embargo, el uso de estos métodos presenta diversos inconvenientes. Si bien son eficaces en la eliminación de las HAPs, no son capaces de cubrir todo el rango de concentraciones (incluyendo las LAPs e incluso las proteínas de media abundancia o MAPs) [18]. Además, estos tipos de columnas de inmunoafinidad sólo son capaces de procesar volúmenes de muestra limitados (15 – 100 µL), por lo que las LAPs se encuentran en concentraciones tan bajas que no son

detectadas por MS. Por ello, sólo los métodos que son capaces de procesar altos volúmenes de muestra pueden concentrar y enriquecer las LAPs de un modo considerable.

- *Métodos de enriquecimiento*: Estos métodos, al contrario que los anteriormente citados, si parecen ser capaces de cubrir, tomando como referencia una muestra de suero humano, casi todo el rango dinámico de concentraciones. Como métodos de enriquecimiento de las LAPs se han utilizado columnas de lecitina para capturar y enriquecer glicoproteínas [19, 20], así como la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), que se utiliza sobre todo para el estudio de fosfoproteínas [21,22]. Sin embargo, ninguno de estos métodos es capaz de abarcar todas las especies presentes en un proteoma determinado, pudiendo tan sólo seleccionar algunas de ellas.

2.5. Uso de las bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos (CPLLs)

Las bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos (CPLLs) representan una metodología alternativa capaz de reducir la concentración de HAPs y de aumentar proporcionalmente la concentración de LAPs. Este método permite capturar y "amplificar" el proteoma de baja abundancia [23-27], lo cual constituye alrededor del 50% del proteoma de las muestras. La reducción del rango dinámico de concentraciones no se consigue en este caso eliminando especies como en el caso de las técnicas de inmuno-sustracción, sino que se obtiene mediante la diferencia de concentración entre los dos extremos.

Conceptualmente, las CPLLs consisten en una colección de hexapéptidos sintéticos unidos covalentemente a un soporte comatográfico esférico poroso. Cuando esta biblioteca de péptidos se incubaba con una mezcla de proteínas cada hexapéptido interacciona específicamente con la proteína, en función de

sus propiedades físico-químicas. Las especies que se encuentran en exceso rápidamente saturan su ligando correspondiente, mientras que las especies poco o muy poco abundantes quedan absorbidas completamente. Las proteínas no enlazadas se eliminan con un paso de lavado, mientras que las proteínas unidas a las esferas son después recuperadas

Así, basándose en la capacidad de capturar cada gen individual y en el principio de saturación-sobrecarga cromatográfica, la metodología CPLL es capaz de enriquecer las proteínas presentes a nivel de trazas mientras que reduce la concentración de las especies más abundantes, consiguiéndose así una gran reducción del rango de concentraciones. Por ello, es posible detectar proteínas, que se encuentran normalmente en concentraciones muy bajas, las cuales serían indetectables mediante otras técnicas analíticas.

2.6. Las CPLLs y el análisis del proteoma

Actualmente, existen CPLLs comerciales [28] si bien la aplicación de las CPLLs para el análisis del proteoma fue propuesta por diversos grupos de investigación [28-29], entre los cuales destaca el grupo del profesor Righetti (Universidad Politécnica de Milán) [30]. En particular, se han empleado tanto bibliotecas conocidas como fabricadas por dicho grupo para explorar las LAPs de una gran diversidad de muestras, tales como orina [31] suero, [32], plaquetas [33], eritrocitos humanos [34], clara [35] y yema de huevo de pollo [36], tejidos vegetales [37], y para la detección de impurezas de proteínas raras presentes en productos rADN destinados al consumo humano [38]. Recientemente, dicho grupo ha extendido el uso de las CPLLs a distintos productos alimenticios, tales como vinos [39-40], cervezas [41], leche de almendras [42], vinagre de vino blanco [43], refresco de cola [44], leche de coco [45], bebidas de jengibre [46], licor Braulio [47] y aceite de oliva [48]. En todos los casos, los resultados obtenidos han sido muy alentadores, ya que todas las especies encontradas no habían sido previamente detectadas en ninguna de estas matrices.

2.7. Referencias

- [1] Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F. *et al.* Science 304 (2004) 66.
- [2] Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates 3rd, J.R., Anal. Chem. 733 (2001) 5683.
- [3] Hubbard, T., Andrews, D., Caccamo, M., *et al.*, Nucleic Acid Res. 33 (2005) 447.
- [4] Uhlén, M., Björling, E., Agaton, C., *et al.*, Mol. Cell. Proteomics 4 (2005) 1920.
- [5] Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 6062.
- [6] Righetti, P.G., Castagna, A., Antonioli, P., Boschetti, E. Electrophoresis 26 (2005) 297.
- [7] Maurya Bharati, D., Pawar Shweta, V., Chate Priya, B., Kayarkar Namita, A., *et al.* Int J. Genetics 1 (2009) 17.
- [8] Issaq, H.J., Electrophoresis 22 (2001) 3629.
- [9] Anderson, N.L., Anderson, N.G., Mol. Cell. Proteomics 1 (2002) 845.
- [10] Lescuyer, P., Hochstrasser, D., Rabilloud, T., J. Proteome Res. 6 (2007) 3371.
- [11] Fang, X., Huang, L., Feitelson, J.S., Zhang, W.W., Drug Discov. Today Technol., 1 (2004) 141.
- [12] Helmerhorst, E.J., Oppenheim, F.G., J. Dent. Res. 86 (2007) 680.
- [13] Walz, A., Stühler, K., Wattenberg, A. *et al.*, Proteomics 6 (2006) 1631.
- [14] Cellar, N.A., Kuppanan, K., Langhorst, M.L., Ni, W., Xu, P., Young, S.A., J. Chromatogr B 861 (2008) 29.
- [15] Fang, X., Zhang, W.W., J. Proteomics 71 (2008) 284.
- [16] Greenough, C., Jenkins, R.E., Kitteringham, N.R., *et al.*, Proteomics 4 (2004) 3107.
- [17] Shaw, M.M., Riedere, B.M., Proteomics 3 (2003) 1408.
- [18] Shen, Y., Kim, J., Strittmatter, E.F., *et al.*, Proteomics 5 (2005) 4034.

- [19] Xiong, L., Andrews, D., Regnier, F., J. Proteome Res. 2 (2003) 618.
- [20] Drake, R.R., Schwegler, E.E., Malik, G., et al., Mol. Cell. Proteomics 5 (2006) 1957.
- [21] Feng, S., Ye, M., Zhou, H., *et al.*, Mol. Cell. Proteomics, 6 (2007) 1656.
- [22] Li, Y., Xu, X., Qi, D., *et al.*, J. Proteome Res. 7 (2008) 2526.
- [23] Righetti, P.G., Boschetti, E., Lomas, L., Citterio, A., Proteomics 6 (2006) 3980.
- [24] Righetti, P.G., Boschetti, E., FEBS J. 274 (2007) 897.
- [25] Boschetti, E., Lomas, L., Citterio, A., Righetti, P.G. J. Chromatogr. A 1153 (2007) 277.
- [26] Boschetti, E., Monsarrat, B., Righetti, P.G., Curr. Proteomics 4 (2007) 198.
- [27] Boschetti, E., Righetti, P.G., BioTechniques 44 (2008) 663–665.
- [28] Boschetti, E., Righetti, P.G., J. Proteomics 71 (2008) 255.
- [29] Thulasiraman, V., Lin, S.H., Gheorghiu, L., Lathrop, J., Lomas, L., Hammond, D., Boschetti, E., Electrophoresis 26 (2005) 3561.
- [30] Boschetti, E., Righetti, P.G., J. Proteomics 71 (2008) 255
- [31] Castagna, A., Cecconi, D., Sennels, L., *et al.*, J. Proteome Res. 4 (2005) 1917.
- [32] Sennels, L., Salek, M., Lomas, L. et al., J. Proteome Res. 6 (2007) 4055.
- [33] Guerrier, L., Claverol, S., Fortis, F. et al., J. Proteome Res. 6 (2007) 4290.
- [34] Roux-Dalvai, F., González de Peredo, A., Simó, C., *et al.*, Mol. Cell. Proteomics, 7 (2008) 2254.
- [35] D'Ambrosio, C., Arena, S., Scaloni, A., *et al.*, J. Proteome Res., 7 (2008) 3461.
- [36] Farinazzo, A., Restuccia, U., Bachi, A., *et al.*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 1241.
- [37] Boschetti, E., Bindschedler, L.V., Tang, C., *et al.*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1215.
- [38] Antonioli, P., Fortis, F., Guerrier, L., *et al.*, Proteomics 7 (2007) 1624.

- [39] Cereda, A., Kravchuk, A.V., D'Amato, A., Bachi, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 73 (2010) 1732.
- [40] D'Amato, A., Kravchuk, A.V., Bachi, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 73 (2010) 2370.
- [41] Fasoli, E., Aldini, G., Regazzoni, L., Kravchuk, A.V., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteome Res. 9 (2010) 5262.
- [42] Fasoli, E., D'Amato, A., Kravchuk, A.V., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 74 (2011) 1080.
- [43] Di Girolamo, F., D'Amato, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 75 (2011) 718.
- [44] D'Amato, A., Fasoli, E., Kravchuk, A.V., Righetti, P.G., J. Proteome Res. 10 (2011) 2684.
- [45] D'Amato, A., Fasoli, E., Righetti, P.G., J. Proteomics 75 (2012) 914.
- [46] Fasoli, E., D'Amato, A., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 75 (2012) 1960.
- [47] Fasoli, E., D'Amato, A., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 75 (2012) 3374.
- [48] Esteve, C., D'Amato, A., Marina, M.L., García, M.C., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteomics 75 (2012) 2396.

**BLOQUE II. SÍNTESIS DE
BIODIÉSEL MEDIANTE
EL USO DE MeOH
SUPERCRÍTICO**

CAPÍTULO 3.

Producción de biodiésel en un reactor discontinuo usando condiciones supercríticas

RESUMEN

En este trabajo se describe el diseño de un reactor discontinuo (*batch*) para producir biodiésel en condiciones supercríticas a partir de un aceite vegetal.

Se han realizado estudios de reproducibilidad en la síntesis de biodiésel con dicho reactor y se han optimizado las condiciones de operación del reactor, mediante el estudio de diversas variables (tiempo de reacción, temperatura, presión y relación molar MeOH:aceite). También, se estudió la influencia de los FFA en la relación molar óptima para la síntesis de biodiésel.

El biodiésel obtenido mediante condiciones supercríticas ha sido comparado con el producido mediante catálisis homogénea. Los resultados muestran que es posible obtener biodiésel en el reactor discontinuo con un grado de conversión superior al 97,5% en tiempos cortos de operación (20 min) y aplicable a materias primas con alto contenido en FFA.

3.1. Introducción

En la actualidad, el biodiésel se ha convertido en una de las fuentes de energía más prometedoras desde un punto de vista sostenible y renovable. Así, el uso de biodiésel en los automóviles y en la industria ha permitido reducir la emisión de gases de efecto invernadero como el SO_2 , hidrocarburos y partículas en suspensión [1]. De hecho, la creciente concienciación hacia el empleo de biocombustibles verdes en automoción ha dado lugar a la utilización de mezclas de biodiésel con diésel en países de la UE. El biodiésel puede producirse a partir de los TGs que existen en la biomasa, tales como: grasas de animales, aceites vegetales (por ejemplo, de maíz, palma, colza y soja) y algas, entre otras materias primas.

La síntesis de biodiésel o la formación de FAMES tiene lugar a través de una reacción de transesterificación de los TGs con un alcohol de cadena corta, habitualmente MeOH. Dicha reacción puede llevarse a cabo con o sin catalizador. En la producción de biodiésel catalizada, el catalizador empleado puede ser una base, un ácido o una enzima. La transesterificación catalizada por álcali suele utilizarse en la producción comercial de biodiésel. En dicho tipo de catálisis, las materias primas ricas en ácidos grasos libres (FFAs) y agua son difíciles de transesterificar de manera eficiente ya que los primeros reaccionan con el catalizador para formar jabones, entorpeciendo además la separación del producto final (biodiésel), mientras que la presencia de agua dificulta la conversión completa de aceites [2, 3]. Para aumentar el rendimiento de la reacción de transesterificación se suele realizar un pretratamiento de la materia prima ácida (con alto contenido de FFAs). Este procedimiento consiste en la esterificación de los FFAs con alcohol usando catálisis ácida [4]. Sin embargo, esta metodología requiere de alta temperatura y largos tiempos de reacción (90 min), lo cual sumado al empleo de condiciones ácidas puede conducir a fenómenos de corrosión del equipo y contaminación del producto final. Por su parte, el uso de la catálisis

enzimática para la producción de biodiésel es desaconsejable por su alto coste originado por la limitada reutilización de la enzima [5].

Con el fin de paliar los problemas asociados a la transesterificación catalítica, la tecnología de fluidos supercríticos propuesta por el grupo de Saka *et al.* [6] es una alternativa adecuada para la producción de biodiésel desde un punto de vista técnico y medioambiental. El alcohol en condiciones supercríticas reacciona con materias primas (*i.e.* aceites refinados) de manera eficaz sin requerir el empleo de un catalizador, pudiéndose alcanzar altos rendimientos (95-98%) [6-9]. Durante el estado supercrítico, los reactivos se calientan y se presurizan al punto crítico del alcohol, de manera que, la mezcla de aceite con alcohol presenta unas propiedades de solvatación y transporte únicas. En las condiciones supercríticas, la inmiscibilidad del alcohol con aceite a temperatura ambiente desaparece, convirtiéndose en una sola fase, reaccionando ambos en un corto espacio de tiempo para producir biodiésel. Además, en el método supercrítico, la acidez y humedad no tienen un efecto negativo en la reacción, como en el caso de la vía catalítica, las etapas de separación/purificación de los productos de reacción son más sencillas que las descritas en los procesos catalizados, y no se generan efluentes contaminantes. Sin embargo, esta tecnología requiere de un reactor supercrítico que pueda soportar altas temperaturas y presiones, lo cual sin duda aumenta los costes de fabricación y mantenimiento [10].

En el presente trabajo, se describe la producción de biodiésel a partir de aceite de girasol utilizando MeOH supercrítico en un reactor discontinuo de acero inoxidable. El diseño del reactor ha sido optimizado atendiendo a criterios de seguridad (empleo de temperaturas $<360^{\circ}\text{C}$) y medioambientales (reducción de cantidades de reactivos y muestras). A continuación, se estudió la influencia de las condiciones de reacción (relación molar MeOH:aceite, temperatura y tiempo de reacción) sobre la producción de biodiésel a partir de aceite de oliva. También, se realizó un estudio de la influencia del contenido de FFAs en el rendimiento (o conversión) del producto biodiésel obtenido

Dichos resultados se compararon con los obtenidos en las metodologías tradicionales de catálisis (básica y ácida).

3.2. Experimental

3.2.1. Reactivos y muestras

Se utilizaron los siguientes reactivos y disolventes: patrones de referencia de ácidos grasos y de sus ésteres metílicos, palmítico (C16:0), heptadecanoico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 cis), eláidico (C18:1 trans) y linoleico (C18:2) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinteim, Alemania); MeOH (99,5%), etanol (96% y absoluto), dietiléter, heptano, hidróxido potásico y monohidrogenofosfato de potasio fueron proporcionados por Panreac (Barcelona, España).

Se utilizaron muestras de aceites vegetales comerciales de girasol. También se preparó una mezcla test de ácidos grasos que contenía C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2.

3.2.2. Descripción del reactor de trabajo

El dispositivo experimental con el que se ha llevado a cabo todos los estudios relacionados con biodiésel supercrítico en la presente tesis, se muestra en la Figura 3.1.

El reactor, básicamente consiste en un tanque fabricado en acero inoxidable AISI 316L con una cámara de reacción dotada de agitación con una capacidad de 1 L. El equipo dispone de una resistencia eléctrica de 4000 W en espiral soldada a la tapa para alcanzar grandes temperaturas. Además, está dotado de un sistema de agitación mecánica de hasta 2000 r.p.m., y un sistema de refrigeración mediante una camisa externa y tuberías para la entrada y toma de muestra así como dos sensores de temperatura termopar tipo J, y dos sensores de presión, uno analógico y otro digital.

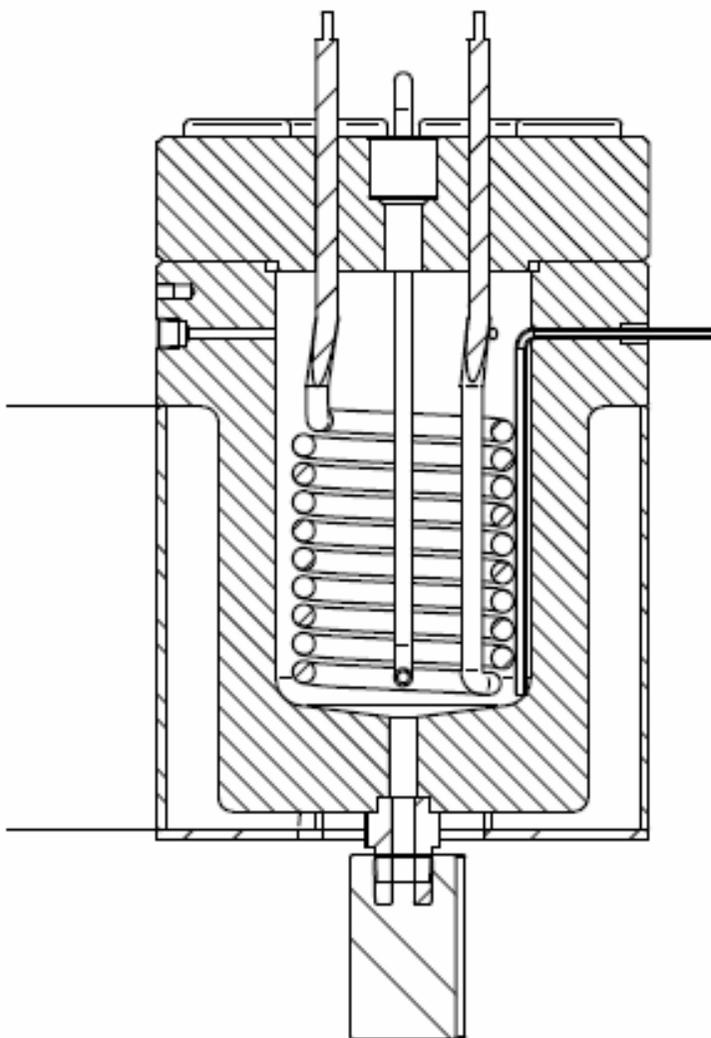


Fig. 3.1. Esquema del reactor discontinuo utilizado en la producción de biodiésel.

El sistema de llenado y vaciado del reactor (Fig. 3.2) está gobernado por un juego de válvulas. Para introducir los reactivos, se llena el depósito con éstos y se ejerce presión con nitrógeno, dirigiendo así la muestra hacia el reactor.

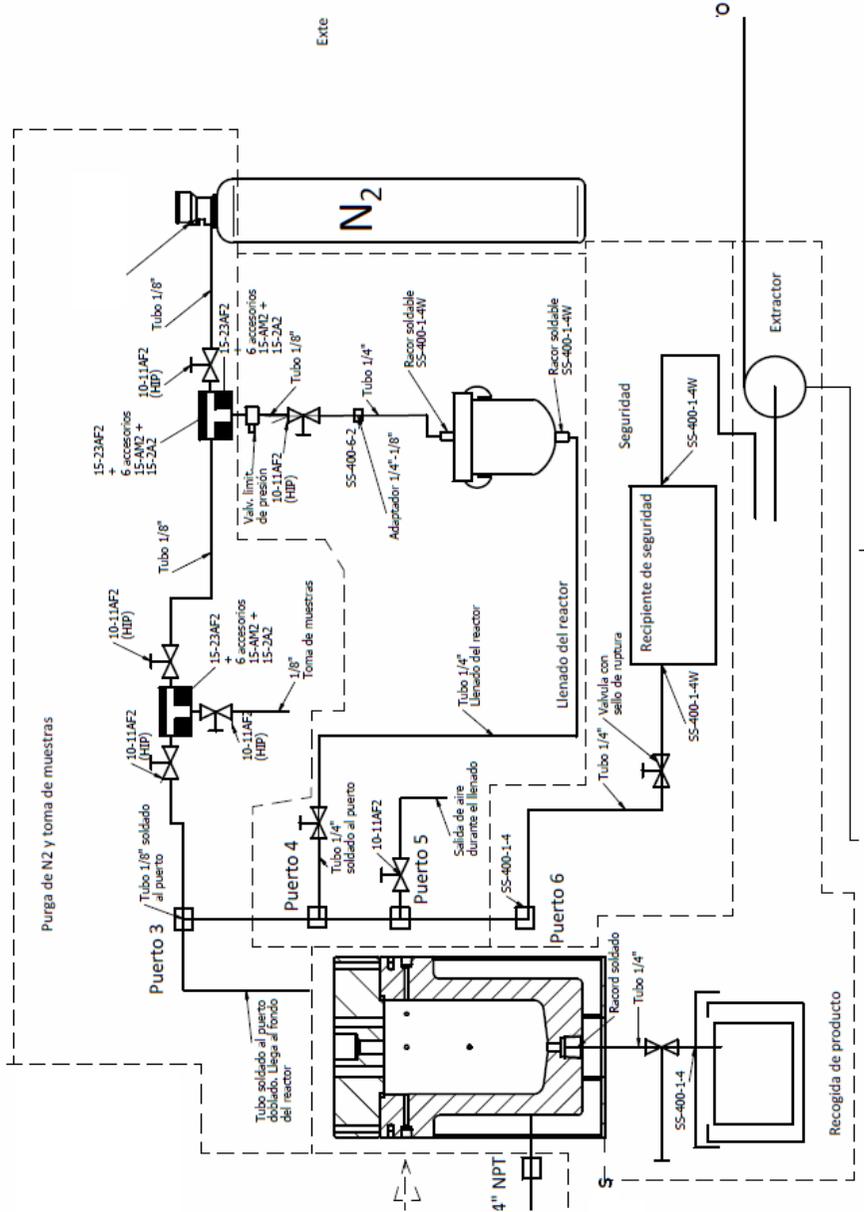


Fig. 3.2. Detalle del sistema de llenado, vaciado y purga del reactor empleado.

Una vez el reactor está lleno se introducen las condiciones de reacción en el sistema. Para lograr que todo el proceso de la muestra ocurra de forma automática, se utilizó un sistema electrónico programable (PLC). De esta manera, es posible programar parámetros como rampas de temperaturas, tiempo de reacción y velocidad de agitación. Además, la reacción se monitoriza a través de una aplicación informática (Figura 3.3).

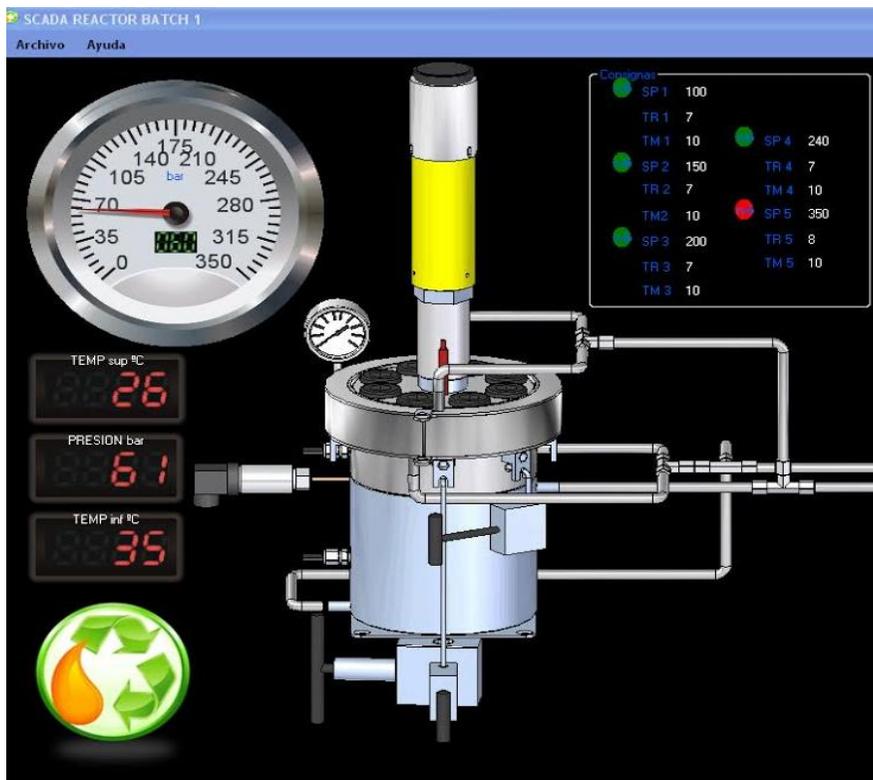


Fig. 3.3. Imagen de la interfaz del PLC de control del reactor.

Cuando se alcanzan elevadas temperaturas una agitación correcta es necesaria, ya que en el caso contrario, se corre el riesgo de que la resistencia genere temperaturas muy altas puntuales alrededor de la misma y podría favorecer procesos de degradación, así como la formación de carbonilla.

Tal y como se ha comentado, el reactor dispone de un sistema de refrigeración externo. Al finalizar el experimento, el sistema PLC inicia el proceso de enfriamiento. Para ello, se conecta la bomba de circulación de agua hasta que se alcanza la temperatura ambiente. Una vez terminado el

proceso, se vacía la camisa mediante una válvula de desagüe, para evitar sobrepresiones en los próximos experimentos. En la Figura 3.4, se observa un plano detallado de la refrigeración del reactor.

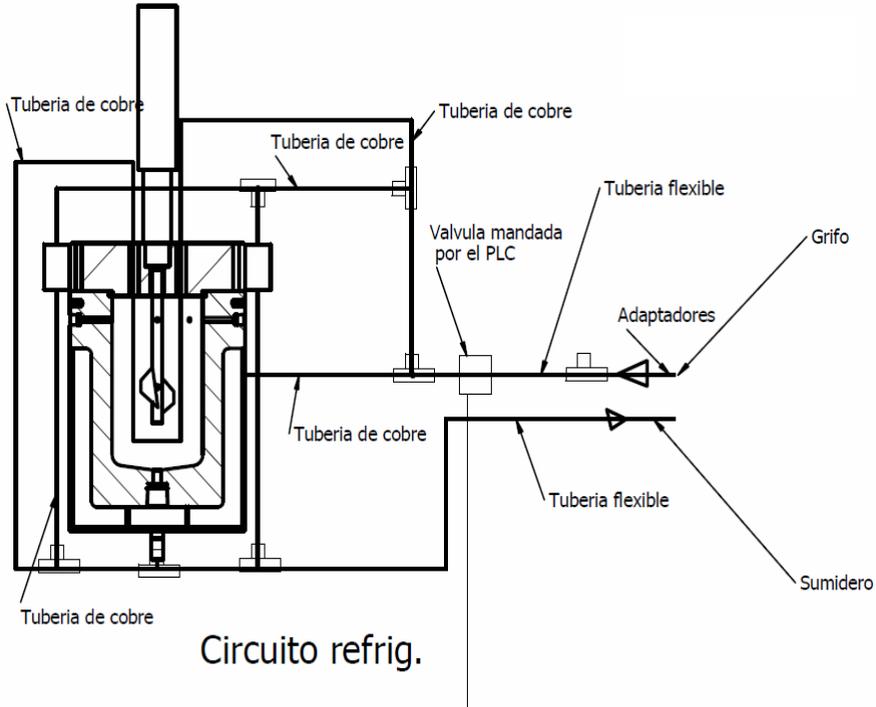


Fig. 3.4. Esquema del sistema de refrigeración empleado en el reactor de producción de biodiésel.

Una vez que la reacción ha terminado, para poder retirar la muestra se genera una sobrepresión con nitrógeno para forzar al producto a salir por la parte inferior del reactor, para su recolección en un depósito preparado para tal fin.

3.2.3. Producción de biodiésel en condiciones supercríticas

Inicialmente, se introducen en el reactor, por sobrepresión, el aceite y MeOH, según las diferentes relaciones molares a estudiar. A continuación, se activa la agitación y la rampa de calentamiento, y se espera a que se alcance la temperatura de residencia para la reacción momento en el cual se comienza a contar el tiempo de reacción. Al final del tiempo estipulado (30 minutos), se apaga el sistema de calefacción, se activa la refrigeración y después del enfriamiento a temperatura ambiente, se recoge la mezcla en un depósito mediante sobrepresión con nitrógeno, tal y como se ha indicado anteriormente.

A continuación, se introduce la mezcla de reacción en un embudo de decantación dejándose reposar durante 6 horas para garantizar la separación de fases a temperatura ambiente. Las dos fases por separado se llevan al rotavapor a 60°C durante 2 horas para eliminar el MeOH presente en ambas fases iniciales. En la fase más pesada, se decanta la Gly, y el biodiésel obtenido se junta con el procedente de la otra fase.

El biodiésel resultante se seca en estufa durante 2 horas a 105 °C para luego ser enfriado en desecador a temperatura ambiente, pesado y almacenado en frasco de vidrio para su posterior análisis. Todos los experimentos y análisis fueron analizados por triplicado.

3.2.4. Producción de biodiésel mediante catálisis homogénea

- Catálisis básica

Se pesan 100 g de aceite vegetal en un matraz de fondo redondo de 250 mL, y se calientan a 60°C, añadiéndose poco a poco 22,5 g de MeOH con KOH al 1%. La mezcla se mantiene bajo agitación a esta temperatura, y a reflujo durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, se deja reposar la mezcla en un embudo de decantación un mínimo de 8 horas. La fase inferior (mezcla de Gly residual, MeOH y sales) se separa, dejando en el embudo la fase superior (conteniendo el biodiésel) para proceder a su lavado.

El biodiésel se lava tres veces con agua acidulada con H_3PO_4 , y después con agua destilada hasta que las aguas de lavado tengan un pH de 7. Una vez obtenido el biodiésel, se calienta hasta 110°C para eliminar los restos de humedad que pudieran quedar, y se guarda en un desecador a temperatura ambiente para su posterior análisis.

- Catálisis ácida y básica

Cuando el porcentaje de FFA en un aceite o materia grasa es superior al 3%, se debe realizar primero una esterificación en condiciones ácidas. Para ello, se añaden 100 g de aceite a un matraz de fondo redondo de 250 mL, se llevan a 60°C , y bajo agitación, se añaden poco a poco 22,5 gramos de MeOH. A continuación, se adiciona H_2SO_4 0,5% (en masa) a la mezcla, y ésta se deja reaccionar durante 50 minutos. Una vez la reacción ha terminado, se deja reposar en un embudo de decantación un mínimo de 2 horas. Una vez decantado, la fase superior (biodiésel) se lava tres veces con agua destilada hasta que las aguas de lavado tengan un pH de 7. A continuación, se calienta hasta 110°C para eliminar los restos de humedad, y se deja enfriar a temperatura ambiente en un desecador, y el producto obtenido se somete al procedimiento de catálisis básica anteriormente descrito.

3.2.5. Efecto del contenido de FFA sobre el rendimiento de la transesterificación de biodiésel

Para investigar el efecto del contenido de FFA sobre el rendimiento del biodiésel, se añadió una cantidad determinada de la mezcla test con varios ácidos grasos a la mezcla de reacción, y se sometió a los procedimientos descritos en los apartados 3.2.3 (transesterificación en condiciones supercríticas) y 3.2.4 (transesterificación con catálisis homogénea).

3.2.6. Metodologías analíticas.

a) Caracterización de la materia prima

Se analizó la acidez de la materia prima según la norma UNE EN ISO 660, resultando una acidez de 0,1mg KOH/g muestra.

b) Caracterización del biodiésel obtenido

Para cada una de las muestras obtenidas de biodiésel, los parámetros a analizar serán la cantidad del producto (biodiésel seco), el contenido en gramos de la fase inferior después del decantado (fase residual de Gly), el índice de acidez y el contenido en FAMES. Dicho contenido fue determinado por cromatografía de gases (GC) en base a la norma UNE EN 14103, mientras que la determinación del índice de acidez se ha realizado con un valorador automático de acuerdo a la norma UNE-EN 14104.

En concreto, para la caracterización y determinación de los FAMES resultantes del proceso de transesterificación se empleó un cromatógrafo de gases Focus GC Trace Ultra equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un automuestreador triplus RSH de Thermo Fisher Scientific (Austin, Tx, EUA).

Las separaciones cromatográficas se efectuaron en una columna capilar SP-2380 (90% biscianopropilo-90% cianopropilfenilsiloxano, 30m, 0,25mm d.i., 0,20 μ m.) de Supelco (Bellafonte, PA, EUA).

Las condiciones del sistema GC-FID fueron las siguientes: volumen de inyección (1 μ L.) con división (1:50), y caudal de He 1,5 mL/min. El programa de temperaturas adoptado se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Programa de temperatura del método GC-FID adoptado.

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo isoterma (min)
-	50	2
20	150	-
4	205	-
20	240	-

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Estudio de la reproducibilidad del reactor

En primer lugar, se decidió estudiar la reproducibilidad que ofrece el reactor en los procesos de transesterificación/esterificación en condiciones supercríticas de aceites u otras materias grasas. Para ello se escogió un aceite de girasol como materia prima y se sometió al proceso de transesterificación en condiciones supercríticas, tal y como se indica en el apartado 3.2.3. Las condiciones elegidas fueron las siguientes:

- Relación molar MeOH:aceite 40:1
- Tiempo de reacción, 20 minutos
- Presión, 20 MPa
- Diversas temperaturas (270-350°C)

Se realizan un total de 40 experimentos, resultado de tratar cada muestra por octuplicado a 5 temperaturas distintas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados de reproducibilidad de la reacción de transesterificación supercrítica de aceite de girasol

T° de reacción (°C)	Presión (MPa)	Oleato de metilo (%)	CV ^a	FAMEs (%)	CV ^a
270	19,96	22,2	2,3	85	0,8
300	20,17	47,2	1,5	98,9	1,7
315	20,14	59,0	1,4	98,3	1,5
330	20,15	62,1	0,8	98,2	1,9
350	20,19	62,6	1,5	95,4	3,9

^a Valores obtenidos como coeficiente de variación (CV) de ocho transesterificaciones independientes para cada temperatura.

Como se aprecia, tanto el porcentaje total de FAMEs como el de los ésteres individuales (véase a modo de ejemplo el oleato de metilo) proporcionan coeficientes de variación inferiores al 4%.

También se decidió evaluar la reproducibilidad de reacciones de esterificación de ácidos grasos en condiciones supercríticas. Para ello se adoptó el procedimiento indicado en el apartado 3.2.3. En este caso, se utilizó una relación molar MeOH:FFA 6:1, mientras que el resto de condiciones de reacción fueron las descritas anteriormente. En la Tabla 3.3 se resumen los resultados obtenidos. Como puede verse, dicha relación ofreció coeficientes de variación de obtención de FAMES por debajo del 5%. Resultados similares se obtuvieron para otros FFA.

Tabla 3.3. Resultados de reproducibilidad de la reacción de esterificación supercrítica de FFA.

T ^a de reacción (°C)	Presión (MPa)	% FAMEs	CV ^a
270	20.18	91,7	3,4
300	22.18	98,3	1,5
315	22.20	99,6	0,3
330	21.96	98,0	2,1
350	22.19	97,1	4,6

^a Valores obtenidos como coeficiente de variación (CV) de ocho esterificaciones independientes para cada temperatura.

Otro parámetro adicional para evaluar la correcta reproducibilidad del reactor es la monitorización de la presión con el tiempo en las etapas de precalentamiento y de reacción en los procesos de transesterificación. En particular, dicha variable (presión) resulta fundamental en el proceso realizado en condiciones supercríticas, ya que un aumento del volumen de MeOH conocido con una variación mínima de temperatura, puede traducirse en un aumento considerable de la presión.

En la Figura 3.5, se muestra la curva de presión obtenida en diversos ciclos (experimentales) de calentamiento y reacción de transesterificación en condiciones supercríticas. Como puede apreciarse, la variabilidad de los valores de presión en las medidas realizadas fue muy pequeña, demostrando así la robustez y la satisfactoria reproducibilidad del reactor diseñado.

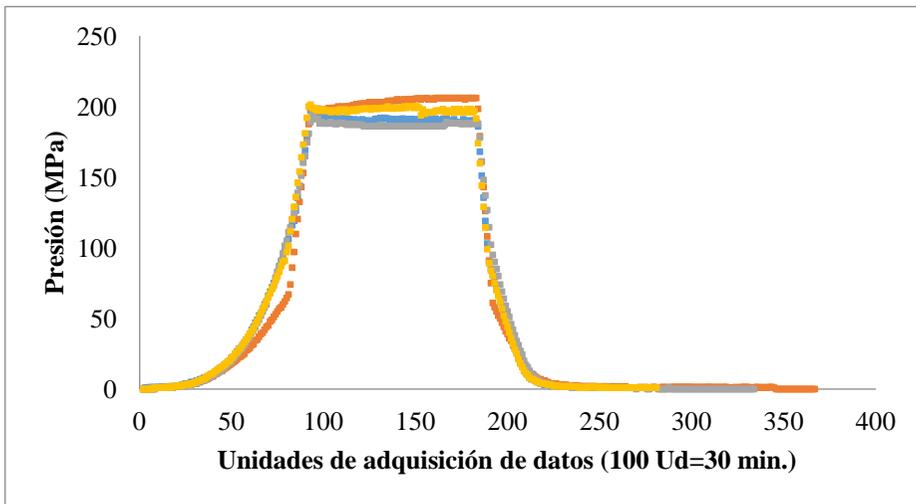


Fig. 3.5. Monitorización de la presión con el tiempo de residencia.

3.3.2. Optimización de las condiciones de reacción

Una vez demostrada la reproducibilidad del reactor *batch*, se estudiaron las condiciones óptimas para el desarrollo de la reacción de transesterificación del aceite de girasol, elegido como más representativo por contar con cantidades significativas de los ácidos grasos más significativos en la mayoría de aceites: palmítico, esteárico, oleico y linoleico. Las variables consideradas

fueron la relación molar MeOH: aceite, la temperatura, el tiempo de reacción y la presión.

En primer lugar, se estudió la influencia de la relación molar MeOH:aceite manteniendo constante el resto de condiciones de reacción, en particular, temperatura 300°C, presión 20 MPa, y tiempo de reacción, 30 minutos. En la Tabla 3.4, se muestra la evolución del porcentaje en FAMEs alcanzado en los experimentos donde se ha variado la relación molar. Se puede observar que el aumento de la proporción molar MeOH:aceite de 3:1 a 40:1 hizo aumentar el rendimiento en éster metílicos del 25% al 99,2%. Sin embargo, los rendimientos se redujeron levemente cuando la proporción de MeOH:aceite fue mayor que 40:1.

Además, una relación molar MeOH: aceite alta puede interferir con la separación de la Gly debido a un aumento en la solubilidad. Además el rendimiento aparente de ésteres puede disminuir debido a que una parte de la Gly permanece en la fase biodiésel [11].

Tabla. 3.4. Influencia de la relación molar MeOH:aceite en el rendimiento de biodiésel. Condiciones experimentales T = 300°C; P = 20MPa; tiempo de reacción = 30 min.

MeOH:aceite	FAMEs (%)
3:1	25
10:1	71
20:1	85,7
30:1	92,5
40:1	99,2
50:1	98,9
60:1	98,1

La temperatura de reacción influye claramente en el rendimiento de producción de biodiésel. A temperaturas de reacción elevadas disminuye la viscosidad de los aceites lo que da lugar un aumento de la velocidad de reacción y a un tiempo de reacción más corto. Sin embargo, varios autores

[12] demuestran que cuando la temperatura de reacción se incrementa más allá del nivel óptimo, el rendimiento del producto biodiésel disminuye debido a que a una temperatura de reacción especialmente elevada acelera la reacción de saponificación de los TGs.

En la Figura 3.6, se muestra la síntesis de biodiésel en el intervalo de temperaturas comprendidas entre 220°C y 380°C. Los resultados experimentales muestran que la conversión del biodiésel aumenta significativamente con la temperatura de reacción de 200 a 300°C.

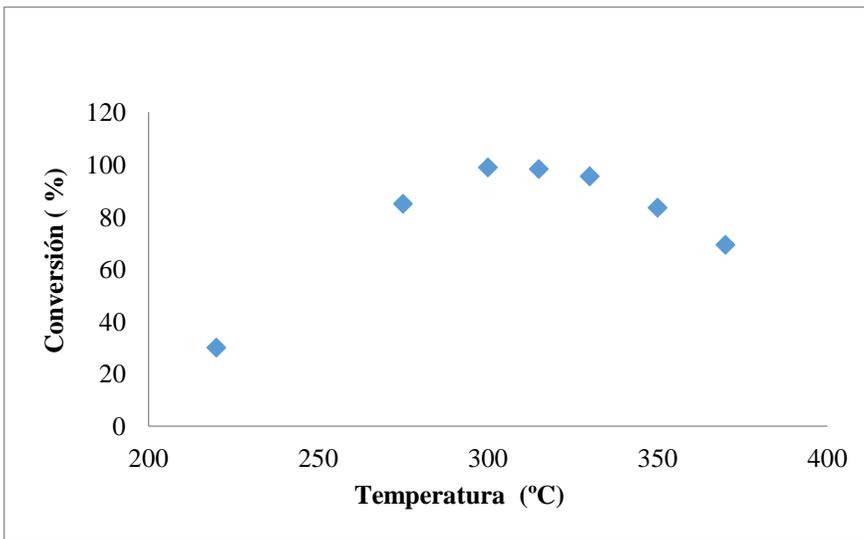


Fig. 3.6. Influencia de la temperatura de reacción en el rendimiento de biodiésel. Condiciones experimentales: MeOH:aceite = 40:1; P = 20 MPa; tiempo de reacción = 30 min.

Por otra parte, temperaturas superiores a 320°C mostraron un descenso de la conversión en biodiésel. Este hecho está en consonancia con los estudios descritos en literatura.

En cuanto al tiempo de reacción (Fig. 3.7), la conversión aumenta con éste. Al principio la reacción es lenta debido a la falta de homogeneidad de la mezcla y la baja difusión del MeOH en el aceite. Como se puede apreciar, se alcanza la conversión máxima a los 20 minutos de reacción. A partir de este valor, no se produce un incremento significativo en el grado de conversión,

por lo que la energía suministrada para tiempos de reacción superiores no compensa desde el punto de vista económico.

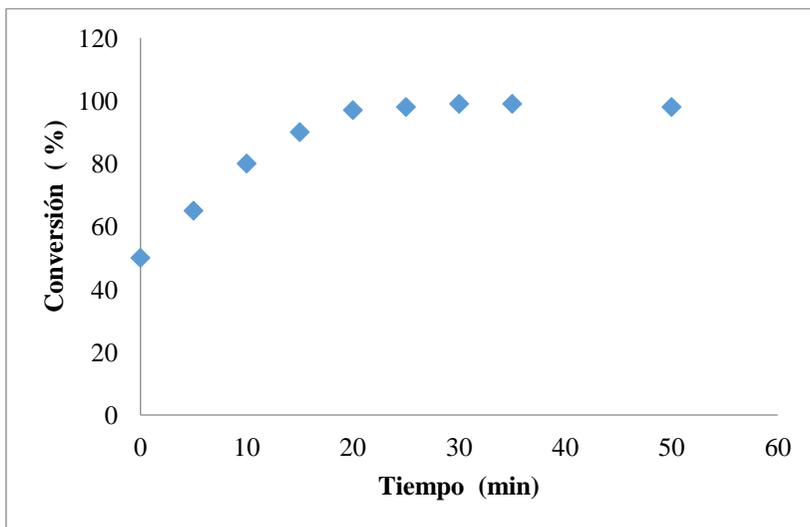


Fig. 3.7. Influencia del tiempo de reacción en el rendimiento de biodiésel. Condiciones experimentales: MeOH:aceite, 40:1; P = 20 MPa; T = 300°C.

Con respecto a la presión (Fig. 3.8), se observa que una vez alcanzado los 18 MPa, se llega a un estado de equilibrio y la conversión permanece constante.

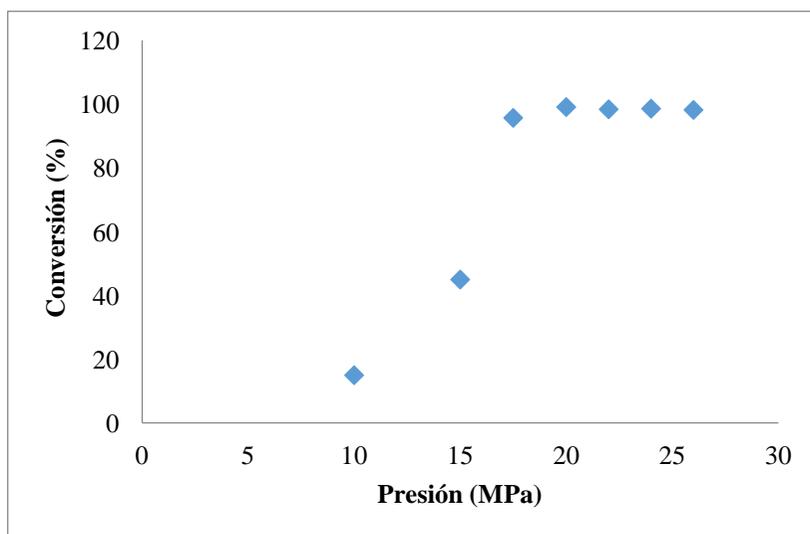


Fig. 3.8. Influencia de la presión en el rendimiento de biodiésel, Condiciones experimentales: MeOH:aceite, 40:1; tiempo de reacción = 30 min; T = 300°C.

A la vista de los resultados anteriores, las condiciones óptimas a las cuales opera el reactor discontinuo para la obtención de biodiésel a partir de aceite de girasol, son las siguientes:

- Relación molar MeOH:aceite: 40:1
- Temperatura: 300°C
- Tiempo de reacción 30min.

3.3.3. Evaluación del contenido de FFA en la producción de biodiésel. Comparación con catálisis química homogénea

La presencia de agua y FFA en materias primas, tienen un efecto negativo sobre la producción de biodiésel [13]. Diversos tratamientos han sido adoptados para reducir este problema: desde pretratamientos de la muestra al empleo de catálisis heterogénea, enzimática, el uso de ultrasonidos y algunas combinaciones de estos métodos [14-15].

Con el fin de evaluar la tolerancia del método propuesto (empleo de MeOH supercrítico) al porcentaje de FFAs, se decidió tratar en las condiciones supercríticas óptimas, diferentes muestras de aceite de girasol a las que se les adicionaron diferentes contenidos de FFAs. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.9.

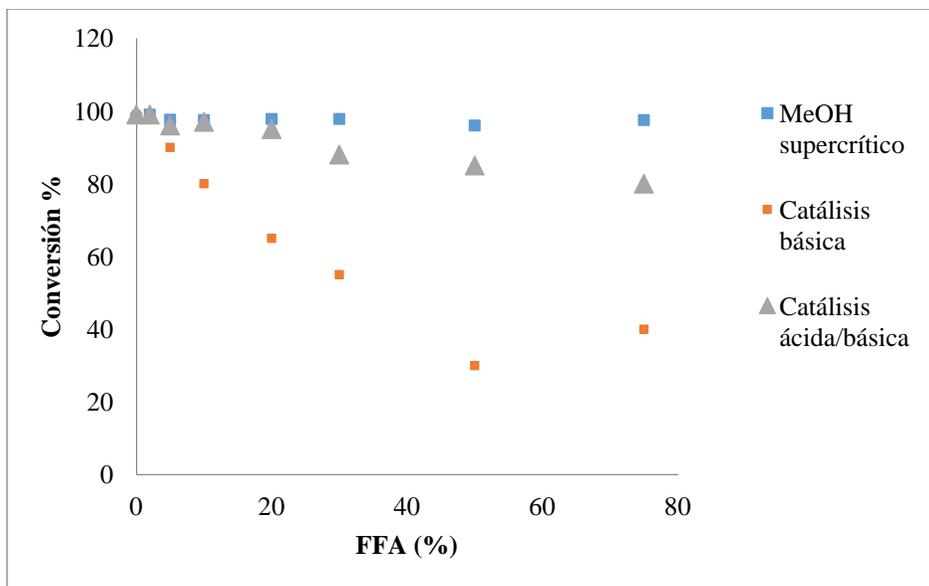


Fig. 3.9. Efecto del porcentaje de FFA sobre la conversión de biodiésel empleando diferentes metodologías.

También, se trataron las materias primas con FFA mediante los procesos catalíticos convencionales.

El proceso de catálisis alcalina, es el método convencional, no tolera materias primas con contenidos de FFA superiores al 3% debiendo recurrir a procedimientos alternativos como el proceso de catálisis homogénea ácida y alcalina. Los aspectos de dichos procedimientos, se encuentran en el apartado 3.2.4.

Como se observa en la Figura 3.9, la presencia de FFA no afecta negativamente al rendimiento de biodiésel mediante el proceso con MeOH supercrítico. Sin embargo, en el caso de la catálisis básica, la conversión del biodiésel se reduce de forma significativa a partir de un 5-10%. Esto es debido a la formación de jabones, los cuales son catalíticamente inactivos, y además emulsifican la fase de glicerina en la fase orgánica, lo que impide la formación de más producto, y dificulta las operaciones de separación y purificación. El proceso de catálisis homogénea combinada (catálisis ácido/base) elimina estos problemas, y permite alcanzar rendimientos

elevados (85-99%). Estos valores pueden ser comparados con los obtenidos con el tratamiento supercrítico, si bien, este es más eficaz a altos porcentajes de FFAS (>20%). Además, es de señalar que el tiempo de residencia en el proceso catalítico básico o ácido/base oscila entre 6 y 8 horas, mientras que el proceso con condiciones supercríticas se reduce considerablemente a 20-25 minutos.

3.4. Conclusiones

Se ha diseñado y construido un reactor discontinuo construido de acero inoxidable y de 1 L de capacidad, y se ha evaluado a diferentes temperaturas y presiones de hasta 350°C y 25MPa, respectivamente. Se ha evaluado su reproducibilidad en términos de producción de FAMES a partir de materias primas naturales (aceite de girasol) como a partir de una mezcla sintética de FFA mediante esterificación. En todos los casos se han obtenido resultados satisfactorios con coeficientes de variación inferiores al 5%.

También se han optimizado las condiciones de reacción para la producción de biodiésel a partir de aceite de girasol, obteniéndose unos rendimientos del 97,6% en tiempos cortos de reacción (20 min).

También se ha evaluado la tolerancia del proceso de síntesis con MeOH supercrítico al contenido de FFA en la materia prima. El rendimiento del biodiésel producido por este proceso es prácticamente independiente del contenido de FFA (trabajando en cada caso con su relación molar óptima) a diferencia del proceso catalítico convencional. Además, la síntesis supercrítica ofrece cortos tiempos de operación y mejores rendimientos que el proceso de catálisis ácida/básica para materias primas con contenidos de FFA superior al 20%.

3.5. Referencias

- [1] Kumar, A., Nerella, N.K.V., *Open Environ. Eng. J.* 2 (2009) 81.
- [2] Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F., *Renew. Sust. Energy Rev.* 11 (2007) 1300.
- [3] Imahara, H., Minami E., S. Hari, S. Saka, *Fuel* 87 (2008) 1.
- [4] Miao, X., Li, R., Yao, H., *Energy Convers. Manage.* 50 (2009) 2680.
- [5] Modi MK, Reddy JR, Rao BV, Prasad RB. *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 1260.
- [6] Saka S, Kusdiana D., *Fuel* 80 (2001) 225.
- [7] He, H., Sun, S., Wang, T., Zhu, S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 (2007) 399.
- [8] He, H., Sun, S., Wang, T., Zhu, S., *Fuel* 86 (2007) 442.
- [9] Demirbas, A., *Energy Convers. Manage.* 49 (2008) 125.
- [10] Ang, G.T., Tan, K.T., Lee, K.T., *Renew. Sust. Energ. Rev.* 31 (2014) 61.
- [11] Van Gerpen, J., *Fuel process. Technol.* 86 (2005) 1097.
- [12] Miao, X., Wu, Q., *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 841.
- [13] Kusdiana, D., Saka, S., *Bioresour. Technol.* 91 (2004) 289.
- [14] Thanh, L. T., Okitsu, K., Sadanaga, Y., Takenaka, N., Maeda, Y., *et al.* *Bioresour. technol.*, 101 (2010) 5394.
- [15] Gole, V. L., Gogate, P. R., *Fuel Process. Technol.* 106 (2013) 62.

CHAPTER 4.

Evaluation of thermal stability and cis-trans isomerization of FAMES in supercritical methanol

ABSTRACT

Biodiesel production by non-catalytic supercritical MeOH reaction has been developed using edible (olive and HO sunflower oils) and non-edible (waste cooking oil) oils.

Due to the requirement of high reaction temperatures in the proposed treatment, the thermal stability of methyl oleate and methyl linoleate, which are the major FAME in this supercritical process, was investigated in different reaction times and temperatures. The results revealed that the thermal stability of methyl linoleate is more sensitive than methyl oleate.

No decomposition and trans isomerization reaction were observed at 270°C for all tested oils; however, the trans isomerization became evident at 350°C (and when the reaction time was extended for 20 min), particularly significant for waste cooking oil.

4.1. Introduction

Biodiesel fuel, as a renewable energy source, is becoming increasingly popular nowadays, since it has emerged as an alternative for fossil fuels in diesel engines [1]. Due to its biodegradable and non-toxic fuel properties, it significantly reduces the greenhouse gas emission and other air pollutants drastically [2]. It can be used directly on the engine or blended with diesel in different proportions according to different requirements [3].

Biodiesel also known as fatty acid methyl esters (FAME) can be manufactured from edible and non-edible sources such as vegetable oils [4], animal fats [5], or waste cooking oils [6]. Currently biodiesel can be produced conventionally by base- or acid-catalyzed routes. However, the problem with base-catalyzed method is that alkalis could lead to saponification since they are sensitive to the presence of water and free fatty acids (FFAs) [2]. It increases the complexity of the method and becomes costly since a purification step is required to remove catalyst and saponified products. Meanwhile acid-catalyzed reaction needs longer reaction period and higher reaction temperature [2]. Taking into account these drawbacks, the biodiesel production technologies shift towards to non-catalyst methods aimed to address such issues. Thus catalyst-free supercritical technology has been proposed to perform transesterification between long-chain triglycerides in oils/fats and alcohol (MeOH or ethanol). This technology is characterized by producing biodiesel without restrictions in the amount of the FFAs and water in the feedstock. In this advanced process, the reaction rate is substantially accelerated since animal fats/vegetable oils and MeOH become a well-mixed homogenous phase after MeOH supercritical point, which implies a reduction of mass transfer limitations [7]. Additionally, the non-catalytic supercritical process has environmental advantages because there is no waste generated as a result of catalyst treatment and separation from the final product. Furthermore, this non-catalytic method does not require pretreatment of the feedstock because impurities in the feed do not strongly affect the reaction.

However supercritical conditions implies high temperatures and pressures (300-350°C/20–50 MPa) to achieve a high yield (> 95%) in short times [5, 8, 9], which requires more energy, a carefully engineered process for energy recovery, and higher investment on the reactor. Owing to these severe conditions, the thermal stability of biodiesel is a major challenge [8, 10]. Excessive reaction temperature and exposure time might lead to fuel degradation and impaired fuel quality. Thermal decomposition reactions of FAMES during supercritical transesterification were first described by Saka *et al.* [11, 12] in 2001. These researchers observed that unsaturated and saturated FAMES begin to decompose at 350 and 400°C, respectively.

However, He *et al.* [13] later pointed out that unsaturated methyl esters containing two or more double bonds (methyl linoleate and linolenate) decomposed above 300°C, while Shin *et al.* [14] showed that their degradation occurred from 330°C. Moreover, Imahara *et al.* [15] observed that saturated FAMES (methyl palmitate and stearate) were stable at 300°C or below, becoming unstable at 350°C, while Shin *et al.* [14] specified that (i) methyl palmitate remained almost stable at 400°C or below, and (ii) methyl stearate was stable below 350°C and decomposed slightly when the temperature rose to 375°C. In the case of methyl oleate (the main monounsaturated FAME generated from most of vegetable oils), it began to be unstable at 375°C [6].

One of the thermal stability problems found during biodiesel production by supercritical MeOH process is the cis-trans isomerization of FAMES (or isomerization of FAMES from cis- to trans-type) [15, 16]. Thus, Imahara *et al.* [15] reported that cis-trans isomerization (on the basis of FT-IR spectra) occurs for poly-unsaturated FAMES (methyl linoleate and methyl linolenate) when relatively high reaction temperatures (>350°C) were applied. Furthermore, the presence of a large content of trans-isomers may have a negative effect on cold flow properties of biodiesel, since these isomers generally have higher melting points than its corresponding cis isomers [17]. Consequently, in order to achieve maximum output of high quality biodiesel,

the effect of temperature and residence (or reaction) time on thermal stability of biodiesel should be investigated in depth.

In this study, a thermal stability study of biodiesel samples from different feedstocks (olive oil, sunflower oil and waste cooking oil) in a stainless steel batch reactor was performed at several residence times and reaction temperatures. In particular, the cis-trans isomerization process underwent by the main FAMES during the thermal treatment in the different raw materials was evaluated. The isomerization products were determined by GC-FID analysis. On the basis of these results, the establishment of optimum conditions that provided the maximum oil conversion to FAME were established for each feedstock.

4.2. Experimental

4.2.1. Reagents and Samples

Olive and high oleic (HO) sunflower oils were used as edible vegetable oils. The fatty acid composition [18] of these two vegetable oils is reported in Table 4.2. Also, waste scholar restaurant cooking oil was used in this study.

Table 4.2. Fatty acid composition of the edible vegetable oils.

	Olive oil	HO sunflower oil
C16:0 (% w/w)	11,6	4,6-4,8
C16:1 (% w/w)	1	0-0,1
C18:0 (% w/w)	3,1	2,3-3,4
C18:1 (% w/w)	75	62,8-87,4
C18:2 (% w/w)	7,8	5,45-27,5
C18:3 (% w/w)	0,6	0-0,1
C20:0 (% w/w)	0,4	0-0,3
C20:1 (% w/w)	0,2	0
C22:0 (% w/w)	0,1	0-0,7
C24:0 (% w/w)	0,1	0-0,3

MeOH (99,5%) used for supercritical transesterification was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Standard references for methyl esters analysis which include methyl palmitate (C16:0), methyl stearate (C18:0), methyl oleate (cis C18:1), methyl elaidate (trans C18:1) and methyl linoleate (Cis/Cis C18:2) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Methyl heptadecanoate (C17:0) (used as internal standard), a 37-component FAME mix and heptane (99,5%) were also purchased from Sigma-Aldrich.

4.2.2. Experimental method

The reaction was carried out using a stainless steel reactor of 1 L capacity. The features of batch reactor were described in Chapter 3 (Section 3.2.2).

To monitoring the reaction yield, at any temperature or time reaction, without modifying the conditions of the system, the reactor was designed and built with side ports to sample small amounts of the synthesized biodiesel.

To investigate the influence of reaction time (0-30 min) and reaction temperature (270-350°C), a MeOH:oil molar ratio of 40:1 was fixed for all the experiments on the basis of our previous work (see Chapter 3).

In order to evaluate the influence of reaction time, the reactor was filled with 220 g of olive oil and 400 mL of MeOH. Then, it was closed and heated up to the target temperature (300°C). The system reached a pressure of 20 MPa, which remained stable during the whole set of experiments. Then, samples 2 mL of as-synthesized biodiesel were taken at different reaction times. Finally, the reaction was quenched by circulating cooling water through the double-wall chamber in order to reach room temperature. Samples were then subjected to GC analysis.

A set of experiments were also performed to investigate the influence of reaction temperature. For this purpose, 200 g of each feedstock (olive oil, HO content sunflower oil and waste cooking oil) was independently treated with 325 mL of MeOH. The mixture was heated up to the target temperature at 20 MPa.

The samples, previous their injection in GC were solved in n-heptane containing C17:0 as internal standard. Finally, the samples were injected, or stored at -5 °C in the sample freezer until their use.

4.2.3. Analytical methods

The analytical procedure and equipment used for the analysis of the final FAME product (from several feedstocks) was described in the previous Section 3.2.6.

The peaks of different methyl esters were identified by comparing the retention time with that of pure methyl ester standard compounds. Their respective concentrations were quantified using the ratio of peak areas (peak of each methyl ester/ internal standard). Calibration curves were linear in the range 1-850 mg/mL. Straight lines with $R > 0.992$ were obtained.

The yield of FAME was calculated as the weight percentage of methyl ester produced over the amount of oil used for reaction.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Influence of reaction time on biodiesel thermal stability

Thermal degradation and isomerization of oleins have already been studied [19], and temperature shows has showed more influence over isomerization than time; thus, times in the range of hours or days are required to observe minor isomerization rates below 300°C, but higher temperatures induce greater changes in less time. Biodiesel is a quite similar fatty acid derived compound, consequently a similar behavior is expected. Furthermore biodiesel synthesis through supercritical route takes place within minutes, then, the influence of reaction time over biodiesel isomerization will probably be negligible. As a consequence this study will only be performed for one feedstock that will be enough to demonstrate this behavior.

Taking in account the optimum conditions featured in the previous Chapter (Chapter 3), thermal stability of FAME from high oleic sunflower oil was studied along the reaction time by keeping the rest of conditions constant (20 MPa, $T = 300^{\circ}\text{C}$ and MeOH:oil molar ratio of 40:1).

The results of cis/trans C18:1 isomer percentages in HO sunflower oil was given in Fig. 4.1.

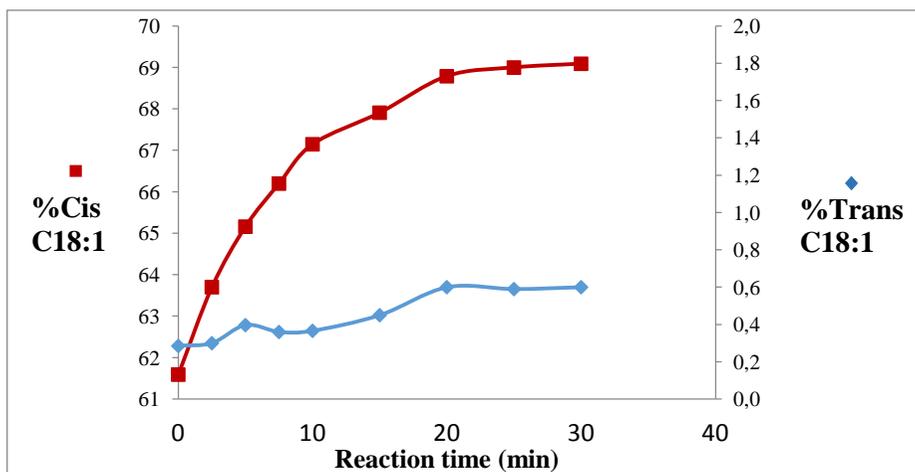


Fig.4.1. Evolution of cis/trans C18:1 as a function of reaction time. Reaction conditions: P = 20 MPa, MeOH:oil molar ratio = 40:1, T = 300°C.

The concentration of cis C18:1 was much higher (61%) than its corresponding trans isomer (0.3%) at zero time (pre-heating). The presence of this small amount of trans C18:1 is probably due to the high temperature of the deodorization process during the oil refining treatment [18]. This probes that pre-heating treatment using the transesterification MeOH method did not produce the isomerization reaction.

After 20 min the level of cis C18:1 reached a maximal value of 69%, while the content of its trans isomer remained constant at 0.4%. Prolonging the exposure time at 300°C did not cause severe isomerization of cis C18:1 isomer. Therefore, a reaction time of 20 minutes at 300°C was selected to produce biodiesel from HO sunflower with insignificant cis/trans isomerization process.

4.3.2. Influence of reaction temperature on biodiesel thermal stability

Next, the thermal stability of FAMES from different oil sources (olive, HO sunflower and waste cooking oil) was studied in supercritical method over a range of temperatures comprised between 270 and 350 °C. After this time, an extra reaction time (20 min) at 350°C was evaluated.

Then, the influence of reaction temperature on the biodiesel thermal stability from sunflower oil was investigated. Figures 4.2 and 4.3 show the chromatograms of main isomers obtained in different oils heated at 300 and 350°C, respectively. As observed in Fig 4.3, several peaks attributed to different isomers of C18:2 were found.

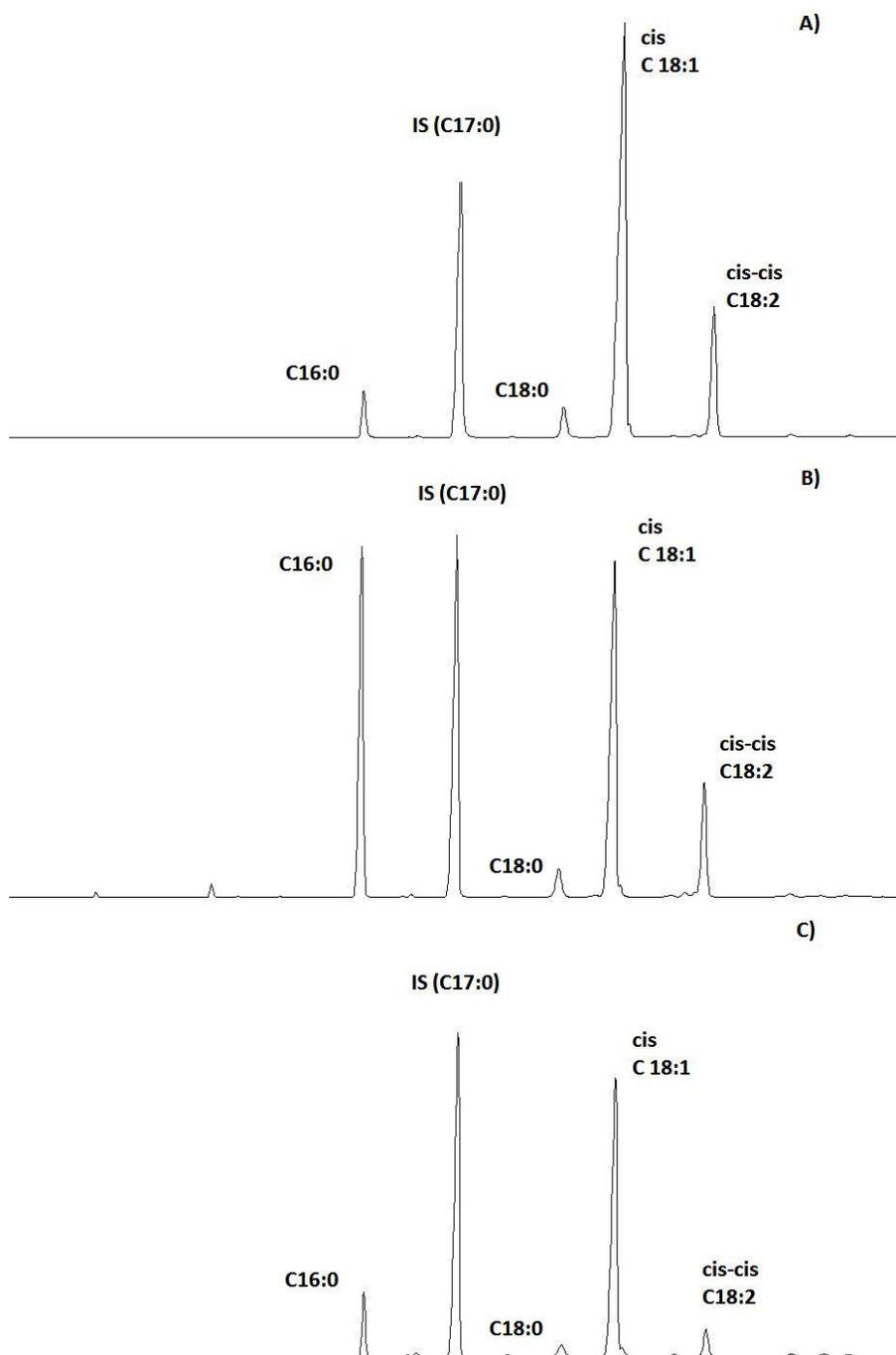


Fig. 4.2. GC Chromatograms of FAMES profile of each oil studied A) High oleic sunflower oil, B) waste cooking oil and C) olive oil. Reaction conditions: P = 20 MPa, T = 300°C, t = 20 min.

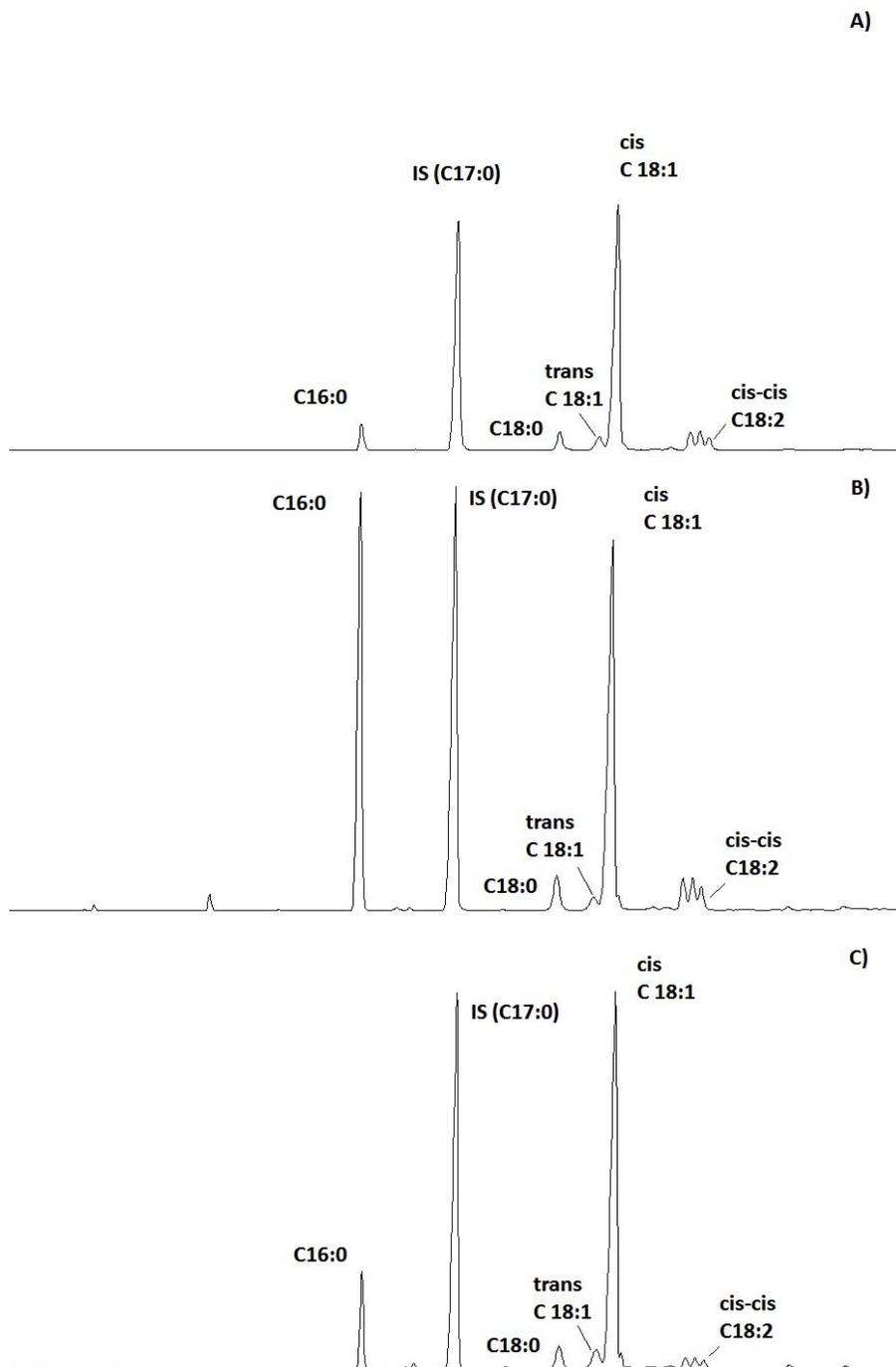


Fig. 4.3. GC Chromatograms of FAMES profile of each studied oil A) High oleic sunflower oil, B) waste cooking oil and C) olive oil. Reaction conditions: P = 20 MPa, T = 350°C, t = 20 min.

Figure 4.4 shows the evolution of cis/trans FAME isomers percentage in biodiesel from HO sunflower oil at different temperatures.

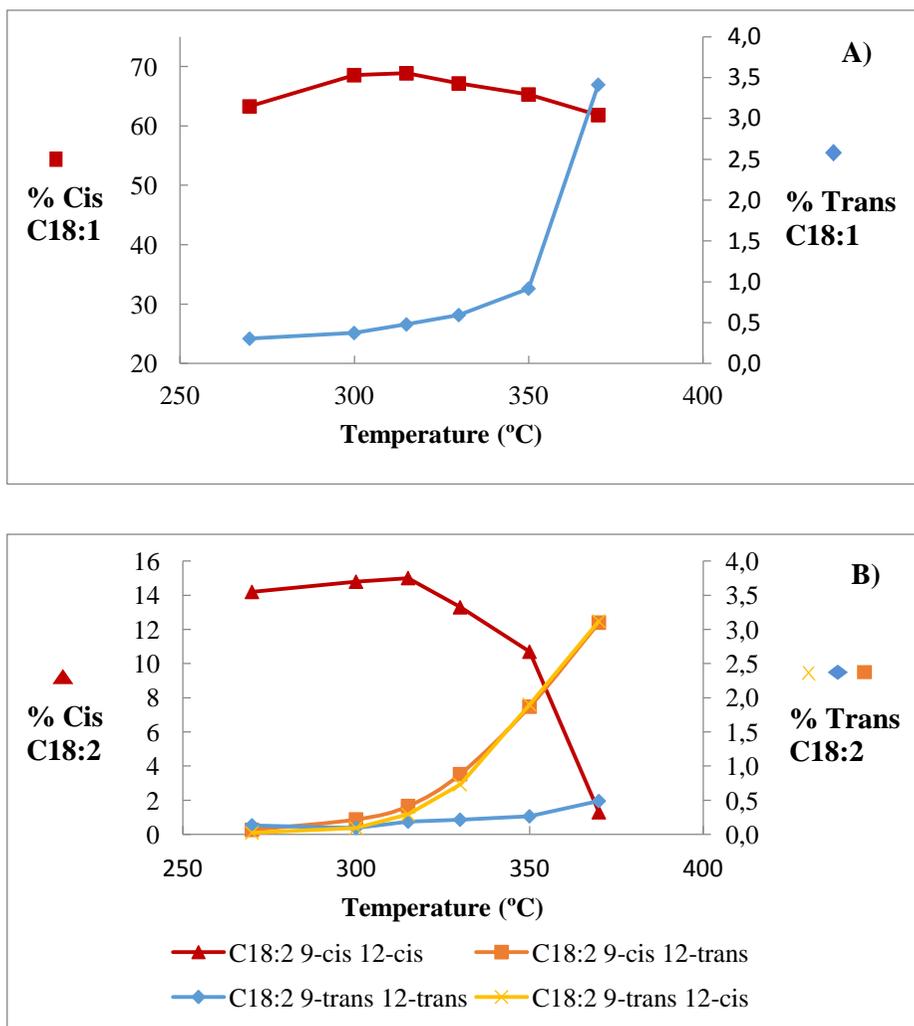


Fig. 4.4. Thermal stability of cis/trans FAME isomers from commercial HO sunflower oil at several temperatures. A) Cis/trans C18:1, B) cis/trans C18:2. Reaction conditions: P = 20MPa, MeOH:oil molar ratio = 40:1. An extra time of 20 min was added at 350°C.

When the temperature increased from 270 to 315°C, the recovery of methyl oleate reached 69%, and decreased slightly at 350°C. When the exposure time at this temperature was extended (20 min), the recovery

of methyl oleate was still high (62%), although a small content (3,5%) of methyl elaidate was present.

Concerning to methyl linoleate, decomposition phenomena can be clearly observed when the temperature was increased from 320 to 350°C (see Fig. 4.4., part B). The decomposition was even more obvious by extending the exposure time at this temperature.

Thus, the *cis* C18:2 isomer percentage decreased down to 1% This finding is consistent with that found previously related with the poor stability of methyl linoleate. This fact in combination with the large content of linoleic acid present in HO sunflower oil, made that this feedstock was more sensitive to high temperatures. Consequently, the employment of sunflower and, high linoleic acid oils, using supercritical conditions to achieve a high yield of biodiesel, could be optimized at 20 MPa in a range of 300-330°C without significant decomposition phenomena.

Waste cooking oils are obtained from edible ones after frying and variable time of use. In this study, waste cooking oil from HO sunflower seed oil (on the basis of FA profile), was selected and its thermal stability on the production of biodiesel (FAMES) was evaluated.

Fig. 4.5 shows the results of *cis/trans* C18:1 FAME isomer concentration after subjected this sample to supercritical MeOH method to synthesize biodiesel. As can be seen from this figure, the optimal yields (43%) of methyl oleate were located in the range of temperatures 300-330°C.

This value was lower than that obtained with sunflower oil. This could be explained by the degradation phenomena suffered during the frying process of oil, which accelerates oxidative reactions of TGs, and consequently, a decrease in the total FAME concentration.

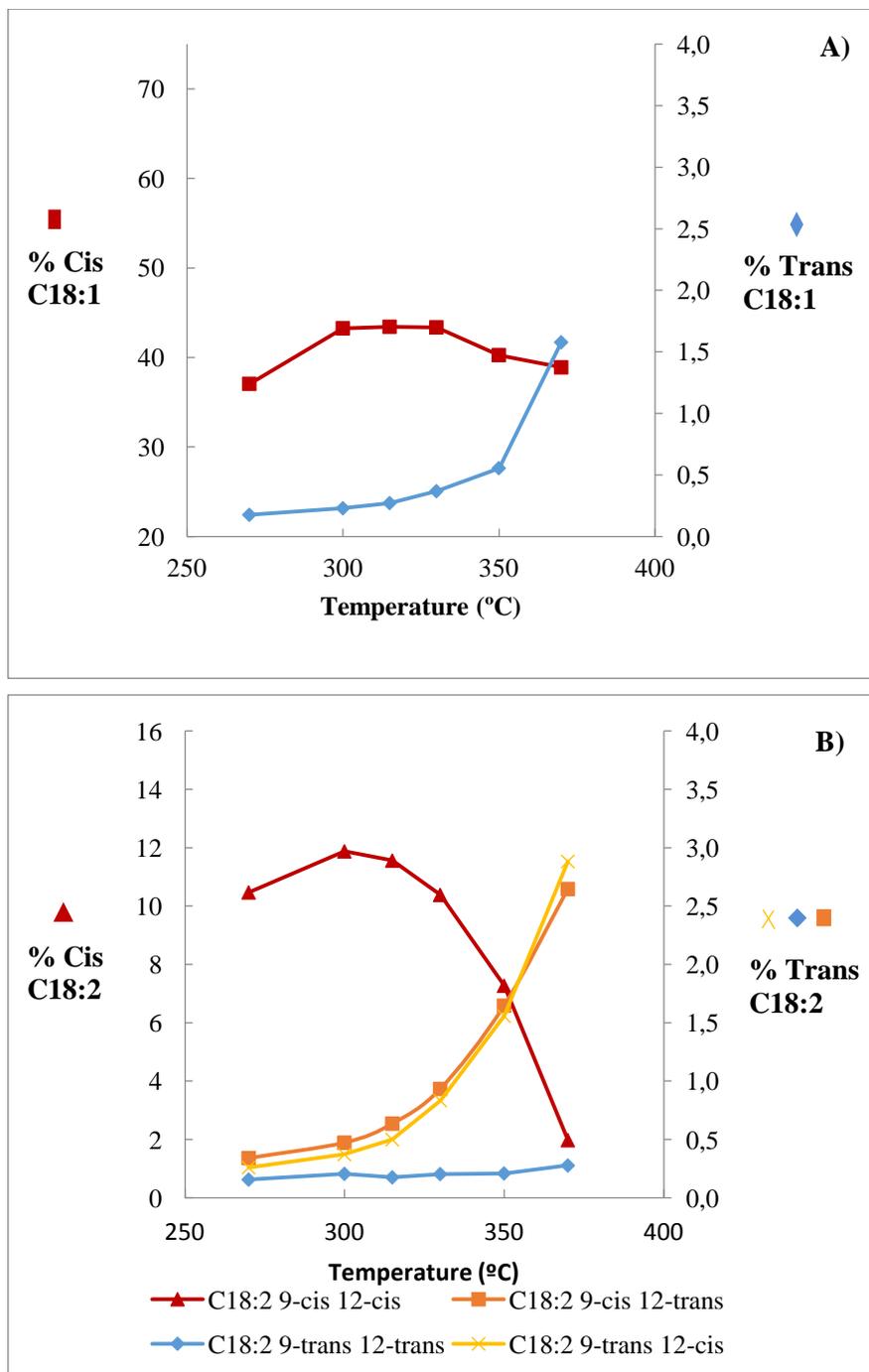


Fig. 4.5. Evolution of main cis/trans isomers in biodiesel from waste cooking oil at several temperatures. A) cis/trans C18:1, B) cis/trans C18:2. Other reaction conditions as in Fig. 4.4.

On the other hand, degradation and trans isomerization of methyl oleate were evident at 350°C, and as when the exposure time at this temperature was prolonged.

In the case of methyl linoleate, the recovery reached a maximal value of 12% at 300°C; however, it was below than that found in the sunflower oil. This demonstrates again that the frying process degraded the feedstock.

Decomposition of cis C18:2 was also significant with further rise in temperature >315°C, being accompanied of trans isomerization reaction at 350°C (including 20 min more).

At sight of these results, the conditions to produce biodiesel with maximum yield from waste cooking oil should be below 315° C and 20 MPa.

Then, the influence of reaction temperature on the biodiesel stability from olive oil was investigated (Fig. 4.6).

It can be seen that the production of C18:1 (cis isomer) in biodiesel sample was only 25% at 270°C. When the transesterification temperature increased from 270 to 350°C the yield of cis C18:1 increased until 72%, whereas only 1% of trans C18:1 was present. However when the exposure time was prolonged 20 min, a recovery of methyl oleate of 66% was obtained, while the methyl elaidate increased up to 4%.

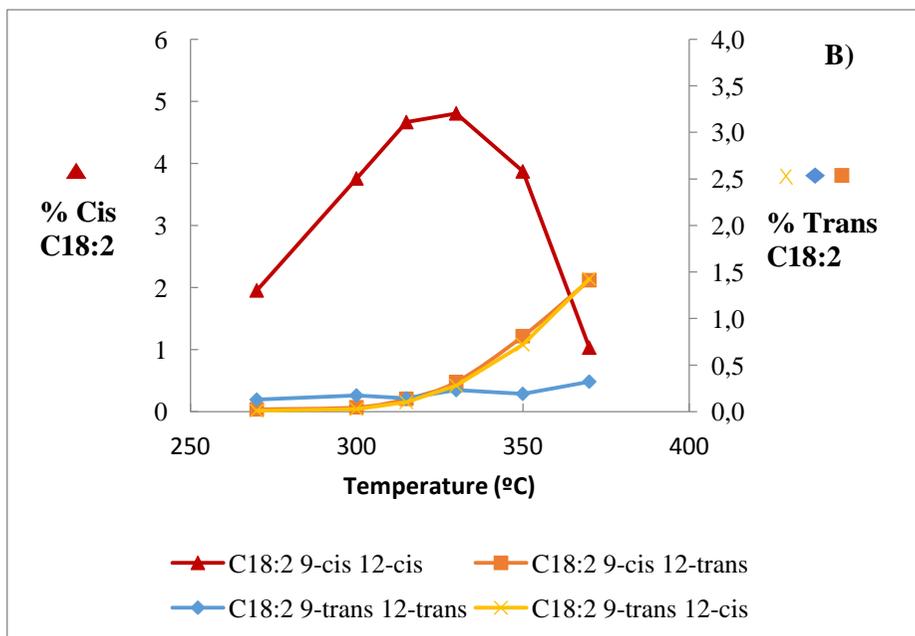
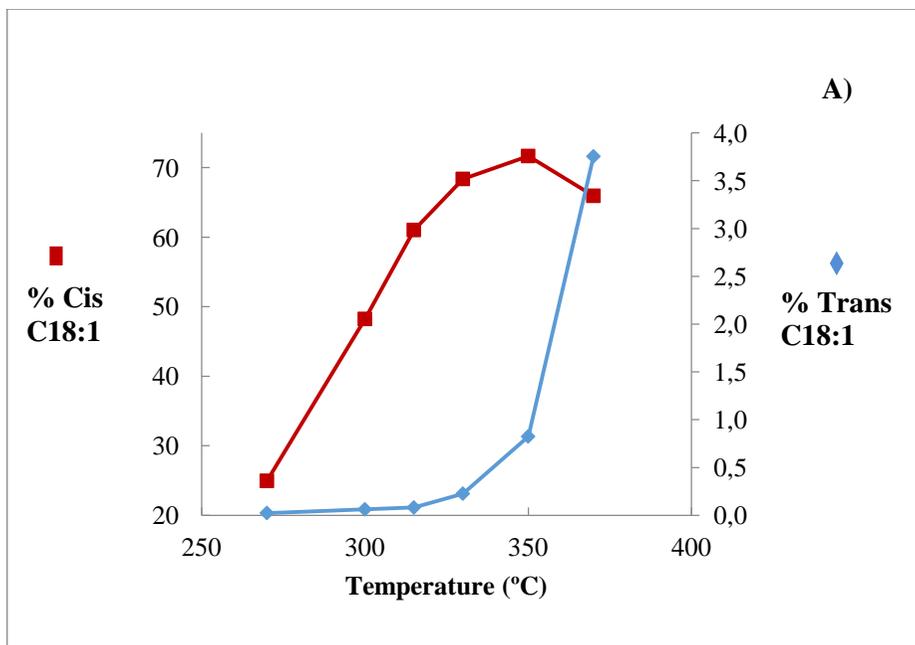


Fig. 4.6. Thermal stability of cis/trans FAME isomers from commercial olive oil at several temperatures. A) Cis/trans C18:1, B) Cis/trans C18:2. Other experimental details in Fig 4.4.

In the case of methyl linoleate in olive oil, a maximal amount of cis C18:2 (5%) was reached at 330°C. An increase in temperature (350°C), a decrease in this value (1%) produced however by prolonging the reaction time for 20 min led to a significant increase in its decomposition (up to 1% of cis C18:2).

From these results, methyl linoleate is more sensitive towards reaction temperatures than the methyl oleate. This behavior is comparable with that reported in literature, which showed that at temperature 350°C decomposition occurs to only PUFAs rather than to all PUFAs and mono unsaturated FAME which are relatively stable at this temperature (with minimal decomposition).

However, due to the low linoleic content present in commercial olive oil, this oil could be employed as feedstock to produce with high yield (94%) and low rates of cis/trans isomerization reactions.

4.3.3. Comparison of FAME production from different feedstock

As show in Fig. 4.7, the FAME content in biodiesel increased with reaction temperature until reaching the optimal conditions, for later showing a FAME decrease due to isomerization/degradation processes.

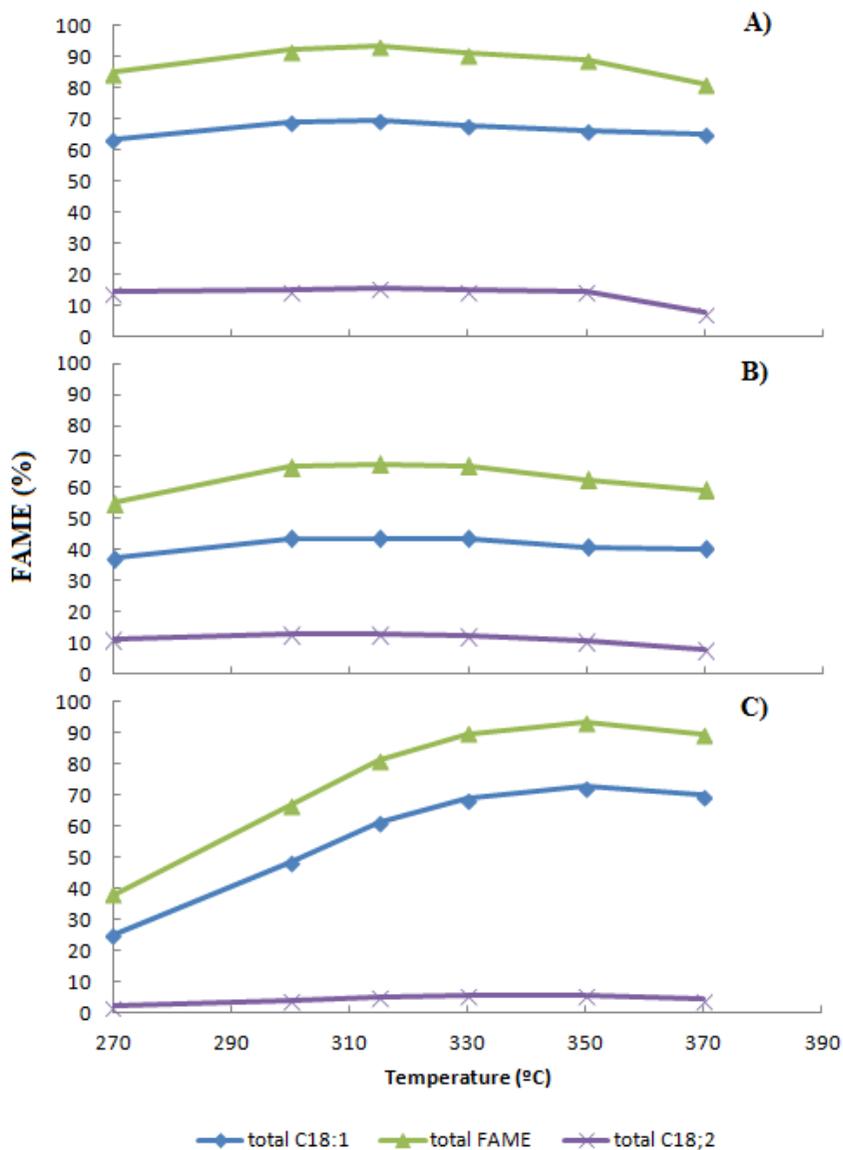


Fig. 4.7. FAME percentage in biodiesel prepared from A) sunflower oil B) waste cooking olive oil and C) olive oil at different reaction temperatures. Reaction conditions as in Fig. 4.4.

The biodiesel from olive oil presented the highest FAME conversion (94%) compared with that from sunflower oil (92%). As show in Fig. 4.7, the FAME composition in biodiesel from these oils was different. Thus, the FAMES from olive oil contained methyl oleate (C18:1), 73%, methyl linoleate (C18:2), 6%, methyl stearate (C18:0), 4% and methyl palmitate (C16:0), 11%. Since olive oil contained oleic acid (75%), linoleic acid (7,8%), stearic acid (3,1) and palmitic acid. (11,6%), FAMES from HO sunflower contained methyl oleate (C18:1), 69 %, methyl linoleate (C18:2), 16% methyl stearate (C18:0), 3% and methyl palmitate (C16:0), 5%. Due to HO sunflower oil contained oleic acid (63-87%), linoleic acid (5-28%), stearic acid (2.3-3,4) and palmitic acid. (4,6 – 4,8%).

4.4. Conclusions

A thermal stability study during biodiesel production by supercritical method route in a batch reactor using different oils has been carried out. This study includes both degradation of FAMES and their trans isomerization reactions. These changes were monitored by using a GC method (able to successfully separate and quantify the cis/trans FAME isomers).

The influence of reaction time and temperature on the yield and thermal stability of biodiesel was studied. As a result of this study, we have found that both variables should be carefully optimized for each feedstock. The results showed that methyl linoleate, was significantly decomposed at 350°C accompanied by trans isomerization reaction, whereas the methyl oleate exhibited a slight change in cis-trans isomerization.

This translates into that to obtain a good yield of biodiesel from olive oil (rich in cis-trans C18:1) could be done at (20 MPa, 330°C) with short reaction time. However, HO sunflower oil, due to its large linoleic acid content, would require reaction temperatures lower than 315°C. In the case of waste cooking oil, the synthesis of biodiesel should be

performed at temperatures below 300°C to avoid more degradation and isomerization reactions in the lipid material.

4.5. References

- [1] Bunyakiat, K., Makmee, S., Sawangkeaw, R., Ngamprasertsith, S., Energy Fuels 20 (2006) 812.
- [2] Lin L, Cunshan Z, Vittayapadung S, Xiangqian S, Mingdong D., Appl. Energy 88 (2011) 1020.
- [3] Jain, S., Sharma, M. P., Renew. and Sus. Energ. Rev. 15 (2011) 438.
- [4] Demirbas, A. Prog. Energy Combust. Sci. 31 (2005) 466.
- [5] Marulanda, V. F., Anitescu, G., Tavlarides, L. L., Energy Fuels 24 (2010) 253.
- [6] Kulkarni, M. G., Dalai, A. K., Ind. & Eng. Chem. Res. 45(2006) 2901.
- [7] Quesada-Medina, J., Olivares-C., P., J. Supercrit. Fluids 56 (2011) 56
- [8] Vieitez, I., Silva, C., Alckmin, I., Castilhos, F., Oliveira, J.V., Grompone, M.A., Jachmanián, I., J. Supercrit. Fluids 56 (2011) 265.
- [9] Lee, S., Posarac, D., Ellis, N., Fuel 91 (2012) 229.
- [10] Deshpande, A., Anitescu, G., Rice, P.A., Tavlarides, L.L., Bioresour. Technol. 101 (2010) 1834.
- [11] Saka, S., Kusdiana, D., Fuel 80 (2001) 225.
- [12] Kusdiana, D., Saka, S., J. Chem. Eng. Jpn 34 (2001) 383.
- [13] He, H., Wang, T., Zhu, S., Fuel 86 (2007) 442.
- [14] Shin, H.Y., Lim, S.M., Bae, S.Y., Oh, S.C., J. Anal. Appl. Pyrol. 92 (2011) 332.
- [15] Imahara, H., Minami, E., Hari, S., Saka, S., Fuel 87 (2008) 1.
- [16] Goembira, F. Shaka, S., Bioresour. Technol. 131 (2013) 47.
- [17] Yori, J.C., D'Amato, M. A., Grau, J. M.; Pieck, C. L., Vera, C. R., Energy & Fuels 20 (2006) 2721.
- [18] Aparicio, R, J.of Chromatogr. A. 881(1-2), (2000). 93
- [19] Christy, A.A.; Xu, Z.H., Harrington P de B. *Chem. Phys. Lipids* 158 (2009) 22

CAPÍTULO 5.

Síntesis de biodiésel de segunda generación a través del uso de MeOH supercrítico

RESUMEN

El biodiésel actualmente constituye una alternativa viable para la obtención de energía limpia y renovable. Sin embargo, las materias primas habitualmente utilizadas (aceites vírgenes o refinados de plantas oleaginosas) no han supuesto una reducción significativa en sus costes para obtener un producto competitivo en el mercado. Para ello, en este estudio, se proponen diversas materias primas alternativas a las usadas tradicionalmente tales como aceites vegetales usados, residuos grasos de animales, algas y aceite de pescado. Dichas materias se trataron en condiciones supercríticas con MeOH para producir biodiésel, optimizándose en cada una de ellas, la relación molar MeOH/aceite/grasa, temperatura y tiempo de reacción. El rendimiento en el proceso de obtención del biodiésel de los residuos de grasas animales y vegetales (con amplio intervalo en valores de FFAs) osciló entre 92-99%. Por su parte, se obtuvieron rendimientos del 88% y 66% a partir de la microalga *Chlorella* y aceite de pescado de Panga. A su vez, estas dos materias primas mostraron un contenido mayor en ácidos grasos poliinsaturados que los encontrados en los aceites usados y en las grasas de origen animal

5.1. Introducción

El biodiésel de primera generación se obtiene generalmente de uno de los cuatro grandes cultivos de oleaginosas (colza, girasol, soja y palma). El uso de estos cultivos para la producción de biodiésel ha sido fuertemente cuestionado por algunos sectores, ya que para ello hacen un extensivo uso de la tierra, y de de irrigación, fertilización y control (herbicidas y plaguicidas), para acabar compitiendo así con el uso primario y de mayor necesidad social: el alimentario [1].

Además del problema social, el uso de estas plantas oleaginosas plantea otro problema adicional: su precio. De hecho, el precio del aceite representa un 75-85% del coste total del biodiésel. Sin embargo la demanda de la producción en todo el mundo ha crecido exponencialmente debido a las leyes gubernamentales existentes en la mayoría de los países que ordenan la utilización de un 10% de energías renovables desde el 2010 [2]. Por lo que, la búsqueda de fuentes no comestibles, estables y baratas es crucial para el desarrollo de la industria del biodiésel, especialmente en países altamente poblados y con escasez de alimentos [3].

Una alternativa al uso de aceites vegetales como fuente para la generación de biodiésel la constituyen los aceites de fritura usados y los residuos grasos animales y vegetales, constituyendo todos ellos una materia prima ideal de bajo coste [4]. Además se ha demostrado que existe una buena disponibilidad de los mismos, por ejemplo, en España se estima que pueden generarse unos 150 millones de litros anuales de aceite vegetal usado [5]. Sin embargo, muchas de estas materias suelen contener niveles altos de ácidos grasos libres (FFAs), pudiéndose alcanzar contenidos superiores al 15% [6], lo cual dificulta el empleo directo de transesterificación mediante catálisis alcalina, y la consiguiente reducción drástica de producción de biodiésel. Por su parte, los procedimientos que emplean catalizadores ácidos para este tipo de muestras son demasiados lentos y tediosos [7]. En este sentido, la tecnología supercrítica representa una alternativa adecuada para la producción de

biodiésel con requisitos energéticos más bajos y reducido impacto medioambiental que las metodologías convencionales [8]. Además, dicha tecnología es compatible con el contenido de agua y de FFAs presente en la materia prima [9, 10].

En los últimos años, el uso de microalgas para la producción de biodiésel ha surgido como otra fuente renovable y prometedora, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas, acumulan entre 20 y 80% de TGs [11], y pueden cultivarse en agua salobre [11, 12]. La composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento de microalgas tienen un efecto importante en el rendimiento de biomasa y en el contenido de lípidos [13]. Por ejemplo, las células del alga verde *Chlorella zofigiensis* obtenidas en condiciones fotoautotróficas muestran un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (49,6%) que los producidos en condiciones heterótrofas (37,4%); sin embargo, el contenido en ácidos grasos monoinsaturados mostró la tendencia opuesta (20,1% y 37,45, respectivamente) [14].

Una fuente potencial relativamente reciente para la producción de biodiésel es la basada en el aprovechamiento de los residuos derivados (escamas, vísceras, espinas, etc) de la industria pesquera para la posterior producción de aceite, el cual constituye una fuente barata y estable para la síntesis de biodiésel. Así, los ácidos grasos altamente insaturados presentes en estos aceites (especialmente en derivados de pescado azul o blanco) pueden mejorar la fluidez del biodiésel a baja temperatura, y por lo tanto, la reducción del punto de obstrucción de filtros en frío. De esta manera, los problemas de adherencia y la congelación asociados a la utilización de biodiésel a bajas temperaturas podrían prevenirse [15]. Sin embargo, los estudios sobre este tipo de materias primas y su uso para la producción de biodiésel son más bien escasos [16, 17].

El objetivo del presente estudio consistió en la utilización de diversas materias primas para producir biodiésel de segunda generación de calidad a

través de la tecnología supercrítica empleando metanol (MeOH). Entre las materias primas estudiadas se encuentran: i) aceites usados y grasas vegetales/animales residuales con un amplio intervalo en el contenido de FFAs, ii) microalgas de la especie *Chlorella*, y iii) aceite extraído de residuos de pescado blanco Panga (*Pangasius hypophthalmus*). Para cada una de las materias consideradas, se optimizaron los parámetros (MeOH:aceite/grasa, temperatura y tiempo de reacción) que influyen en el proceso de producción de biodiésel.

5.2. Experimental

5.2.1. Reactivos y materias primas

Se utilizaron los siguientes reactivos y disolventes: patrones de referencia de ésteres metílicos de los siguientes ácidos grasos: palmítico (C16:0), heptadecanoico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (cis C18:1), eláidico (trans C18:1) y linoleico (C18:2), reactivo derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), y patrones de referencia de monooleína, dioleína, trioleína, Gly, (tricapina), 1,2,4-butanotriol, 1,2,3-tricaproilglicerol, los cuales fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steintem, Alemania); MeOH (99,5%), etanol (96% y absoluto), dietiléter, heptano, piridina, hidróxido potásico e hidrogenofosfato de potasio fueron proporcionados por Panreac (Barcelona, España).

Para la síntesis de biodiésel se ha usado aceites residuales de diversa naturaleza. Dichas materias primas han sido recogidas y suministradas por la empresa Bioverde (Taubaté S.P., Brasil), También se han empleado dos materias primas no alimentarias con alto contenido en PUFAs: microalgas fotoautótrofas *Chorella*, y aceite de Panga (*Pangasius hypophthalmus*), subproducto de la industria alimentaria.

5.2.2. Descripción del reactor y condiciones utilizadas para la producción de biodiésel

El reactor utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación/esterificación en medio supercrítico fue el indicado en el Capítulo 3 (apartado 3.2.2). El procedimiento experimental de transesterificación utilizado se basó en el descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.2.3), si bien se hicieron ligeras modificaciones en función de las características de las materias primas, las cuales se describen a continuación.

Muchas de las materias primas tratadas son sólidas a temperatura ambiente, presentando grumos e impurezas. Cuando fue necesario, se realizó una filtración en caliente (40°C) utilizando un tamiz de luz de malla de 5 mm de tamaño de poro. En muchos casos no se pudo utilizar el sistema habitual de entrada de muestra al reactor recurriéndose a su introducción por la parte superior del reactor.

Al utilizar algas como materia prima, se realizó el siguiente tratamiento. Se introducen las algas en una estufa a 105°C durante 1 hora, y a continuación se dejan enfriar en un desecador. Seguidamente, se introducen 150 g (peso seco) en el reactor junto a 200 g de MeOH. A continuación, se lleva a cabo la reacción de transesterificación durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo de residencia, se enfría el reactor y se recoge la mezcla resultante. Dicha mezcla presenta dos fases bien diferenciadas: una fracción líquida (mayoritaria, y principalmente constituida por MeOH y biodiésel) y otra sólida (constituida por los restos de las microalgas). Para separar las dos fases se realiza una filtración a vacío, desechándose la fracción sólida. La fase líquida se trató de acuerdo al procedimiento descrito en el Capítulo 3 (véase apartado 3.2.3).

Con respecto al aceite de pescado, se siguieron los procedimientos descritos en los apartados 3.2.3 y 3.2.4.

a) Caracterización de materias primas

Se realizaron medidas de los siguientes parámetros: acidez y % H₂O. La determinación del índice de acidez se realizó con un valorador automático según la norma UNE-EN 14104. En la Tabla 5.1, se muestran las diferentes materias primas utilizadas para la producción de biodiésel. Estas materias primas se pueden clasificar según su origen estableciéndose dos grandes grupos: muestras de origen animal y de origen vegetal.

Tabla 5.1. Acidez y contenido en agua de aceites y grasas residuales usados como materias primas.

Materia prima	Proveedor	Índice de acidez (mg/g)	% H ₂ O
Aceite recuperado	Dajac	0,11	0,084
Grasa de pollo	Big Frango	0,68	0,240
Sebo Bruto	Triângulo	7,51	0,089
Aceite recuperado OSD/OSR	BioVerde	11,19	0,804
Aceite de cocina	Triângulo	45,22	0,780
Ácido graso bruto	Tecno oil	111,45	0,940
Ácido graso bruto de sebo	JBS	178,19	0,680

Con respecto a las muestras con un alto contenido en PUFAs (microalgas y aceite de pescado), además de la acidez y contenido en agua, (véase tabla 5.2) se obtuvo su perfil en ácidos grasos, de acuerdo a la norma EN 15779, (véase Tabla 5.3).

Tabla 5.2. Índice de acidez y contenido en agua en microalgas y aceite de pescado.

Materia prima	Índice de acidez (mg/g)	% H ₂ O
Microalgas	0,7	0,05
Aceite de pescado	7,1	0,20

Tabla 5.3. Perfil de ácidos grasos presentes en microalgas y aceite de pescado.

Tipo de ácido graso	Microalgas	Aceite de pescado
	% (m/m)	% (m/m)
C14:0	16,2	6,6
C14:1	0,2	-
C15:0	0,3	0,5
C16:0	11	16,1
C16:1	7,3	8,5
C18:0	0,6	3,3
C18:1	19,3	10,2
C18:2	21,9	4,1
C18:3	9,9	3,1
C20:4	0,5	
C20:5	2,6	22,4
C22:0	0,1	-
C22:1	0,5	-
C24:1n9	-	0,6
C22:6	9,3	13
FA total ^a	99,6	88,2

^aFA total: Contenido de ácidos grasos totales.

b) Caracterización de biodiésel

Se analizó la calidad del biodiésel obtenido, a partir del proceso de transesterificación, de acuerdo a la normativa europea (UNE EN-14214) evaluándose los siguientes parámetros: índice de acidez, contenido en FAMES y glicéridos.

Para la caracterización y determinación de los FAMES por GC, se sigue el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.2.6).

Por su parte, el análisis de glicéridos (MG, DG y TG) y Gly se realizó adaptando la norma UNE-EN 14105:2003. En concreto, se basa en la transformación de los glicéridos y la Gly en sus respectivos derivados sililados, que son más volátiles. La sililación se llevó a cabo usando MSTFA y en presencia de piridina. El método utiliza dos patrones internos: 1,2,4-butanotriol (1 mg/mL, disolución 1) y 1,2,3-tricaproilglicerol (tricaprina) (8 mg/mL, disolución 2). Se pesaron 100 mg de muestra en un vial de 10 mL y,

posteriormente, se añadieron 80 μL de disolución estándar nº 1, 100 μL de disolución estándar nº 2 y 100 μL de MSTFA, evitando el contacto con la humedad. A continuación, se cerró el vial, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 8 mL de heptano y se inyectó una alícuota de 2 μL en el cromatógrafo de gases.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Producción de biodiésel de 2ª generación a partir de materias primas residuales con amplio intervalo de acidez

Se estudiaron diversos parámetros para cada materia prima tales como: relación molar MeOH:aceite (entre 4:1 y 50:1), tiempo de reacción (1-60 min) y temperatura (275-330°C).

En la Tabla 5.3, se muestran las condiciones óptimas obtenidas para cada tipo de materia prima estudiada. Los resultados muestran un grado de conversión muy elevado (superando generalmente el 90%), para la mayoría de las materias primas tratadas.

Tabla 5.3. Condiciones óptimas para la síntesis de biodiésel en diferentes materias primas residuales.

Materia prima	IAi ^a (mg/g)	MeOH: aceite	t(min)	T (°C)	IAf ^b (mg/g)	Conversión (%)
Aceite recuperado	0,11	40,9	30	300	0,36	92,3
Grasa de pollo	0,68	38	30	300	4,90	94,2
Sebo bruto	7,51	39,3	30	300	7,30	93,3
Aceite recuperado OSD/OSR	11,19	18,9	30	300	1,20	98,6
Aceite recuperado de fritura	45,22	19,8	30	300	0,20	95,2
Ácido graso bruto	111,45	7,3	15	310	3,30	94,8
Ácido graso bruto de sebo	178,19	6,5	30	300	8,90	93,1

^aIAi: Índice de acidez de la materia prima.

^bIAf: Índice de acidez del producto final de reacción.

Como puede apreciarse, dichas condiciones de síntesis están fuertemente influenciadas por la naturaleza de la materia prima a tratar, estando éstas muy condicionadas por la relación molar MeOH:aceite. Cuando la materia prima está formada principalmente por un único componente (TGs o FFAs), la relación molar óptima se acerca a la relación óptima encontrada para cada componente (véase Capítulo 3). Teniendo en cuenta lo anterior, las muestras de aceite recuperado, grasa de pollo y sebo en bruto están constituidas fundamentalmente por TGs, mientras que las muestras de ácido graso bruto y ácido graso bruto de sebo, presentan una composición cercana a los FFAs. En cambio, para las muestras con contenidos intermedios de TGs y FFAs se obtuvieron relaciones molares óptimas intermedias. Así pues, en resumen, el grado de acidez de las materias primas influye directamente sobre las condiciones óptimas de síntesis de biodiésel, condicionando principalmente la relación molar de reactivos óptima a emplear (MeOH:aceite) por encima del resto de parámetros de reacción. Estos son los 3 resultados más representativos encontrados:

- Acidez de partida de IA= 0 a 10 en materia prima. Dado que se trata de una materia prima con muy poca acidez, la práctica totalidad de su contenido son TGs, y la relación molar MeOH:aceite óptima es aproximadamente 40.
- Para materias primas con IA entre 10 y 100, la relación molar óptima es también intermedia, y situándose, alrededor de 20.
- Para materias primas con IA >100, la relación molar óptima se acerca a 6.

5.3.2. Síntesis de biodiésel de segunda generación a partir de materias primas con alto contenido en PUFAs

5.3.2.1. Transesterificación directa de algas mediante MeOH supercrítico

Se estudiaron diversos parámetros de reacción tales como: relación molar MeOH: aceite (de 20:1-50:1), tiempo de reacción (15-40 min), temperatura (275-330°C), obteniéndose como condiciones óptimas de síntesis las

siguientes: relación molar MeOH: aceite, 40:1; temperatura, 300°C (para la cual se alcanza una presión de 20 MPa) y tiempo de reacción de 25 min.

Las muestras de biodiésel obtenidas se analizaron por GC-FID para establecer el contenido y distribución de los diferentes FAMES presentes (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Contenido y distribución de los FAMES presentes en biodiésel de algas obtenido con MeOH supercrítico.

FAMES	% (m/m)
C14:0	16,17
C14:1	0,29
C15:0	0,21
C16:0	10,78
C16:1	11,59
C18:0	0,51
C18:1	20,14
C18:2	19,8
C18:3	7,21
C20:4	0,04
C20:5	0,19
C22:0	0,09
C22:1	0,41
C22:6	0,17
FAME total^a	87,6

^aFAME total: Contenido de FAMES grasos totales.

Tal y como se aprecia, el grado de conversión final es bastante elevado (87,6%). A su vez, el biodiésel de microalgas obtenido es rico en una alta proporción de ésteres metílicos de ácidos grasos monoinsaturados (31,9%) y poliinsaturados (27,4%). Los ésteres mayoritarios encontrados son: C18:1 (20,14%), C18:2 (19,80%), C14:0 (16,71%), C16:1 (11,59%), C16:0 (10,78%) y C18:3 (7,21%).

Si se compara esta tabla con la Tabla 5.3., se observa que la extracción de los lípidos del interior de las células de las microalgas se realizó de forma bastante satisfactoria ya que el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados obtenido en el biodiésel, se corresponde bastante bien con el porcentaje en ácidos grasos encontrados la materia prima. No obstante, existe

una pérdida de aproximadamente un 15% de FAMES debido a una ruptura de las cadenas poliinsaturadas de diversos ácidos durante el proceso de síntesis supercrítica.

A la vista de estos resultados, una alternativa interesante a desarrollar sería la separación previa de los PUFAs presentes en las microalgas (para así su revalorización posterior en la industria de la nutrición), de manera que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados puedan utilizarse para la síntesis de biodiésel. Esta opción asegura un biodiésel rico en FAMES saturados, con un mayor índice de cetano, poder calorífico y estabilidad térmica, convirtiéndolo en candidato ideal para su mezcla con otro biodiésel deficitario en este tipo de FAMES o bien biodiésel rico en PUFAs.

5.3.2.2. Transesterificación de aceite de pescado

Al igual que en la muestra anterior, se investigaron los siguientes parámetros: relación molar MeOH: aceite, (de 20:1-50:1), tiempo de reacción (15-40 min), temperatura (275-330°C), encontrándose que las condiciones óptimas de síntesis son: relación molar MeOH: aceite, 40:1; temperatura de 300°C (para la cual se alcanza una presión de 20 MPa) y un tiempo de reacción de 25 min.

Las muestras de biodiésel obtenidas se analizaron por GC-FID para establecer el contenido y distribución de los diferentes FAMES presentes, (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Contenido y distribución de los FAMES presentes en biodiésel de aceite de pescado obtenido con MeOH supercrítico.

FAMES	% (m/m)
C14:0	6,8
C15:0	0,5
C16:0	15,9
C16:1	8,2
C18:0	3,4
C18:1 cis	7,0
C18:1 trans	3,4
C18:2	2,0
g-C18:3	0,1
a-C18:3	0,4
C20:5	3,7
C24:1n9	0,6
C22:6	1,0
C22:6n3	2,3
FAME total^a	55,2

^aFAME total: Contenido de FAMES grasos totales

Bajo dichas condiciones se obtiene un contenido total de FAMES del 55,2%, siendo el biodiésel de pescado obtenido rico en una alta proporción de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados (26,6%) y monoinsaturados (19,2%). Los ésteres mayoritarios encontrados son: C16:0 (15,9%) C16:1 (8,2%), C18:1 (7,0%), C14:0 (6,8%). Si se compara esta tabla con la Tabla 5.3, se puede observar que existe una pérdida de 33% del contenido de FAMES, debido a la descomposición térmica de los PUFAs que pasan de un 43 a un 10%. No obstante, el rendimiento para la transesterificación/esterificación de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados de la materia prima fue satisfactorio.

5.4. Conclusiones

Se ha producido biodiesel de 2^a generación por la vía supercrítica a partir de materias primas muy variadas tales como grasas animales residuales, subproductos de la industria del biodiesel catalítico, ácidos grasos, aceites vegetales usados, microalgas y aceite de pescado. En cada caso, se han optimizado las condiciones de reacción (relación MeOH/aceite, temperatura y tiempo de reacción).

En el caso de aceites vegetales usados, grasas animales y otros subproductos con amplio intervalo en el contenido de FFAs, las condiciones óptimas de síntesis están fuertemente influenciadas por la naturaleza de la materia prima y su acidez, lo cual condiciona la relación molar óptima de MeOH:aceite/grasa. Cuando la materia prima está formada principalmente de un único componente (TG o FFAs), la relación molar óptima se acerca a la esperable para ese único componente (véase Capítulo 3). En cambio, las muestras con contenidos intermedios de glicéridos y ácidos grasos presentan relaciones molares óptimas también intermedias. No obstante, en cualquier caso, se obtuvieron rendimientos satisfactorios comprendidos entre 92-99%.

En el caso de microalgas y aceite de Panga, se obtuvieron rendimientos inferiores (88% y 63%, respectivamente), lo cual puede estar relacionado con el alto porcentaje de PUFAs presente en las materias primas, y su pérdida o degradación (de un 15 a un 35%) durante la síntesis de biodiesel en condiciones supercríticas. A la vista de los resultados anteriores, algunas de las materias primas descritas se plantean como alternativas económicamente viables para la producción de biodiesel. Además, ello facilita que desde un punto de vista técnico, se valore el aprovechamiento de este tipo de desechos o residuos, así como la reducción de la contaminación generada en este tipo de industrias.

5.5. Referencias

- [1] Pinzi, S., Garcia, I.L., Lopez-Gimenez, F.J., de Castro, M.D.L., Dorado, G., *Energy & Fuels*, 23 (2009) 2325.
- [2] Canakci, M., Sanli, H., *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35 (2008) 431
- [3] Cvengros, J., Cvengrosova, Z., *Biomass Bioenergy*, 27 (2004) 173.
- [4] Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Badruddina, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjukia, H. H., Mekhilef, S., *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16 (2012) 2070.
- [5] <http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/domesticos/fracciones/aceites-cocina>
- Revisado 17 de octubre de 2015
- [6] Balat, M., y Balat, H., *Progress in biodiesel processing. Applied Energy*. 87 (2010) 1815.
- [7] Marchetti, J.M., Errazu, A.F., *Biomass Bioenergy*, 32 (2008) 892.
- [8] Madras, G., Kolluru, C., Kumar, R., *Fuel*, 83 (2004) 2029.
- [9] Saka, S., Kusdiana, D., *Fuel*, 80 (2001) 225.
- [10] Boer, K.D., Bahri, P.A., *Biomass Bioenergy*, 35 (2011) 983.
- [11] Chisti, Y., Yan, J., *Applied Energy*. 88 (2011) 3277.
- [12] Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X., *Applied Energy*, 88 (2011) 3402.
- [13] Sims, R. y Christenson, L., *Biotechnology Advances*. 29(2011) 686.
- [14] Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., Chen, F., *Bioresource Technology*, 102 (2011) 106.
- [15] Knothe G., *Fuel Process. Technol.* 86 (2005) 1056.
- [16] Lin, C.Y., Li, R. J., *Fuel Processing Technology* 90 (2009) 130.

[17] Lin, C.Y., Li, R. J., Fuel Processing Technology 90 (2009) 883.

**BLOQUE III.
CARACTERIZACIÓN DE DE
BEBIDAS ALCOHÓLICAS
MEDIANTE TÉCNICAS
ANALÍTICAS DE ELEVADA
RESOLUCIÓN**

CHAPTER 6.

**Artichoke and Cynar liqueur: two (not quite)
entangled proteomes**

ABSTRACT

Combinatorial peptide ligand libraries (CPLs) have been adopted to investigate the proteome of artichoke extracts, of a home-made alcoholic infusion and of Italian Cynar liqueur. The aim of study was not only to perform the deepest investigation so far of the artichoke proteome but also to assess the genuineness of the commercial aperitif via a three-pronged attack. First, different extraction techniques have been used for the characterization of the artichoke's proteome, secondly a home-made infusion has been analyzed and finally the proteome of the commercial drink was checked. The artichoke proteome has been evaluated via prior capture with CPLs at four different pH (2.2, 4.0, 7.2 and 9.3) values. Via mass spectrometry analysis of the recovered fractions, after elution of the captured populations in 4% boiling SDS, we could identify a total of 876 unique gene products in the artichoke extracts, 18 in the home-made infusion and no proteins at all in the Italian Cynar liqueur, casting severe doubts on the procedure stated by the manufacturer (that should be made by an infusion of artichoke leaves plus thirteen different herbs). This could be the starting point for investigating the genuineness and natural origin of commercial drinks in order to protect consumers from adulterated products.

6.1. Introduction

Globe artichoke (*Cynara scolymus L.*) is a perennial thistle of the genus *Cynara* originating in Southern Europe around the Mediterranean. Today this plant, belonging to the Asteraceae family, is grown not only in the Mediterranean countries but also in the United States. The main European artichoke producers are Italy, Spain, and France with an annual production (2010) of 480112 tonnes, 166700 tonnes and 42153 tonnes respectively, according to FAO [1]. As vegetable, globe artichoke is very important in human nutrition and its consumption has increased after the Mediterranean diet has been recognized as the intangible Cultural Heritage of Humanity (UNESCO). The immature inflorescence (capitulum or more commonly “head” or “bud”) can be consumed fresh, canned or frozen. Artichoke leaf extracts contain many compounds commonly used in herbal medicine as hepatoprotectors and choleric agents [2-4], as antioxidants against free radical damages [5] and as inhibitors of both cholesterol biosynthesis and arteriosclerosis [6-10]. Artichoke components are also responsible for inhibition of HIV integrase [11,12] and for antibacterial and antifungal activities [13, 14]. The biomolecules of pharmaceutical and nutraceutical interest [15] are mainly represented by flavonoids and phenolic acids, particularly caffeic acid and its derivatives mono- and bi-caffeoylquinic acids [16-18]. Recently it has been reported that cynaporicin from *Saussurea lappa* has in vitro anti-inflammatory effects via its inhibition of production of inflammatory mediators [19]. Moreover artichokes leaf extracts are currently used in Germany and in Switzerland as remedy for indigestion [20, 21].

In accordance with artichoke digestive properties and with the relevance of Italian artichoke production, in 1952 Angelo Dalle Molle prepared a dark liqueur with artichoke leaves and a selection of 13 herbs. This famous Italian liqueur, called "Cynar" (16.5% alcohol), can be served as a digestive after meal or over ice as an aperitif or as a cocktail mixed with orange juice,

especially popular in Switzerland. In fact it's largely exported in the entire world, especially in Brazil and Switzerland.

Although the current interest in human healthcare of artichoke components is increasing, its proteome has not been completely explored. Only recently the purification of a soluble peroxidase (artichoke leaves peroxidase) was performed by application of proteomic tools [22]. Therefore the proteomic approach could offer the possibility to identify artichoke proteins, allowing the investigation of their relationships with human health. This article aims at increasing the knowledge of artichoke leaves proteome and to detect artichoke proteins both in the popular Italian liqueur and in a home-made infusion, prepared in our laboratory following the industrial procedures. In order to achieve a complete protein characterization, the choice of a performant protein extraction protocol and of a sample preparation technology able to detect the entire artichoke proteome is fundamental. In this paper we report the application of a protein extraction method for globe artichoke leaves coupled to the use of combinatorial peptide ligand libraries (CPLLs), the latter having the function to compress the protein dynamic range in these complex samples. The CPLLs technology is commercially available since 2008 with the trade-name of ProteoMiner (Bio-Rad). This material is composed by an organic polymer onto which are grafted millions of highly diversified hexapeptides, able to achieve ligand saturation only with high-abundance proteins and at the same time to bind a sufficient quantity of low-abundance proteins to allow their detection. Initially CPLLs were applied only to biological fluids [23, 24], but during the years the technology has improved its efficiency [25-27] and today it is considered a premier tool in the proteome investigation of beverages and foodstuff [28-37]. In the present study, we have applied the CPLLs technology as an enrichment tool to artichoke leaves extracts, to a home-made artichoke infusion and to the commercial Cynar liqueur. The final identification of captured proteins has been performed by nLC-MS/MS analysis.

The present research project has been undertaken not just for a mere identification of as many as possible proteins in artichoke leaves, but also for the detection of plant proteins in the Italian liqueur stated to be an infusion of such leaves, i.e. “Cynar”, which is largely consumed not only in Italy but all around the world. Our argument was that the detection of vegetable proteins (if any) in this aperitif could prove the genuineness of this alcoholic drink, while additionally guaranteeing consumers' protection against adulteration and imitation products invading the market [37]. In fact in the “Cynar” label the producers report that it's an artichoke leaves infusion with addition of 13 selected herbs and plants, including the bark of the Cinchona tree, rich in quinine.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Chemical and biologicals

ProteoMinerTM (combinatorial hexapeptide ligand library beads, PM), Laemmli buffer, 40% acrylamide/Bis solution, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), molecular mass standards and electrophoresis apparatus for one-dimensional electrophoresis were from Bio-Rad Laboratories, Hercules CA. β -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), ammonium persulfate, 3-[3-cholamidopropyl dimethylammonio]-1-propanosulfonate (CHAPS), acetonitrile (ACN), trifluoroacetic acid (TFA), sodium dodecyl sulphate (SDS), formic acid (FA) and all other chemicals used all along the experimental work were current pure analytical grade products and purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Complete protease inhibitor cocktail tablets and sequencing grade trypsin were from Roche Diagnostics, (Basel, Switzerland)

6.2.2. Plant materials and protein extraction protocols

Six globe artichokes were bought at the supermarket, belonging *C. cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) Hegi. They were Italian traditional local varieties namely *Romanesco* and *Violetto di Toscana*, typical spring species.

After elimination of external leaves and stem, the capitulum was cut and washed with a 0.5% SDS solution so as to remove surface contaminants. For preparation of artichoke extracts, 45 grams of cleaned leaves were chopped finely (minced) in 100 mL of physiological saline solution or in the same volume of denaturing buffer in order to test different buffer efficiency of protein solubilization. The native extraction buffer contained 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl and 2% (m/v) CHAPS, whereas the denaturing buffer contained additionally 1% (m/v) SDS and 25 mM DTT dissolved into the same buffer. Protease inhibitor cocktails were added to both extraction buffers in order to prevent protein degradation by protease action. The artichoke homogenate was centrifuged at 18000 rpm for 10 min to separate the insoluble debris from the clarified protein solution. The supernatant, obtained from the extraction method using SDS/DTT, was diluted 1:10 (v/v) with an extraction buffer containing 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 25 mM DTT and protease inhibitor cocktail in order to reduce the amount of SDS to 0.1% (m/v) and allow an effective protein capture [38]. Three technical replicas on two different biological samples were performed. As regards the home-made infusion, the artichoke homogenate was firstly prepared in native conditions, as described before in order to mimic the industrial production, secondly mixed to pure ethanol up to a final alcoholic concentration of 70% and finally stirred at room temperature for 3 days to improve protein extraction in the organic solution. The insoluble materials were separated by centrifugation (18000 rpm for 10 min) and the alcoholic supernatant was diluted to a final ethanol concentration of 16.5%, which is the same percentage of commercial drink.

6.2.3. ProteoMiner treatment

Each sample (both artichoke extracts, home-made infusion and Italian Cynar liqueur) were titrated to different pH values (4.0, 7.2 and 9.3) [39] and, subsequently, individually added with 100 μ L of ProteoMiner beads overnight at room temperature under gentle shaking. The last CPLLs incubation was

performed by reducing the pH at a value of 2.2 with addition of 0.1% TFA and formic acid in order to mimic reverse phase conditions for the capture of hydrophobic proteins. After centrifuging at 4000 rpm for 5 min, the beads were washed with their respective buffers and the captured proteins were then desorbed (twice, with 100 μ L each time) with a solution composed of 4% SDS and 20 mM DTT for 5 min, under boiling conditions [40].

6.2.4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Twenty microliter of each bead eluate, in presence of Laemmli buffer (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue and 0.125 M Tris HCl, pH approx. 6.8), were loaded onto the gel. The SDS-PAGE gel was composed by a 4% polyacrylamide stacking gel (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS) cast over an 8–18% resolving polyacrylamide gel (in 375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS buffer). The cathodic and anodic compartments were filled with Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.1% SDS. Electrophoresis was at 100 V until the dye front reached the bottom of the gel. Staining and destaining were performed with Colloidal Coomassie Blue and 7% acetic acid in water, respectively. The SDS-PAGE gels were scanned with a VersaDoc imaging system (Bio-Rad).

6.2.5. Mass spectrometry and data analysis

The sample lanes of SDS PAGE were cut in twelve pieces along the migration path and proteins were reduced by 10 mM DTT, alkylated by 55mM iodacetamide and digested overnight with bovine trypsin. The tryptic mixtures were acidified with FA up to a final concentration of 10%. Eight microliters of tryptic digest for each band was injected in a nano chromatographic system, UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Scientific). The peptide mixtures were loaded reversed-phase trap column (Acclaim PepMap100, C18, 100 \AA , 100 μ m i.d. x 2 cm, Dionex) for the cleanup and pre-concentration. After cleanup, the valve was switched to place the trap column in series with a fused silica reverse-phase column (picoFrit

column, C18, 2,7 μm , New Objective). The peptides were eluted with a 30 min gradient from 4% buffer A (2% ACN and 0.1% FA in water) to 60% buffer B (2% water and 0,1% FA in ACN) at a constant flow rate of 300 nL/min. The liquid chromatography was connected to an LTQ-XL mass spectrometer (Thermo Scientific) equipped with a nano spray ion source. Full scan mass spectra were acquired in the mass range m/z 350 to m/z 1800 Da and the three most intense ions were automatically selected and fragmented in the ion trap. Target ions already selected for mass spectrometry (MS/MS) were dynamically excluded for 30 s. The MS data were analyzed separately by Mascot search engine (version 2.3.01), using Proteome Discover software (v. 1.2.0 Thermo) and consulting first of all contaminants database (version 13/05/2010, downloaded from <http://\maxquant.org\downloaded.html>) to eliminate protein interference problems. The unassigned signals were searched by consulting the Uniprot_viridiplantae (30264 sequences, 184678199 residues). We set oxidation of methionine residue as variable modification; two missed cleavages were allowed to trypsin; peptide mass tolerance was set to 1 Da, fragment mass tolerance to 0,8 Da. The false discovery rate was obtained by selecting the automatic decoy database searching of Mascot and was less of 4%.

Protein identifications were accepted if they contained at least two identified peptides. Two biological replicates and three technical replicates were performed and the proteins listed in the Supplementary table 1[41] were accepted only if they were found in two of the three replicates. The Gene Ontology analysis was performed using the web available software QuickGO (www.ebi.ac.uk/QuickGO).

6.3. Results

Figure 6.1 presents the general scheme of artichoke protein extraction, of home-made infusion preparation and of the various CPLLs captures.

The SDS-PAGE profiling of artichoke proteins presents the initial extracts (controls) and the eluates obtained after CPLLs treatment (Fig. 6.2).

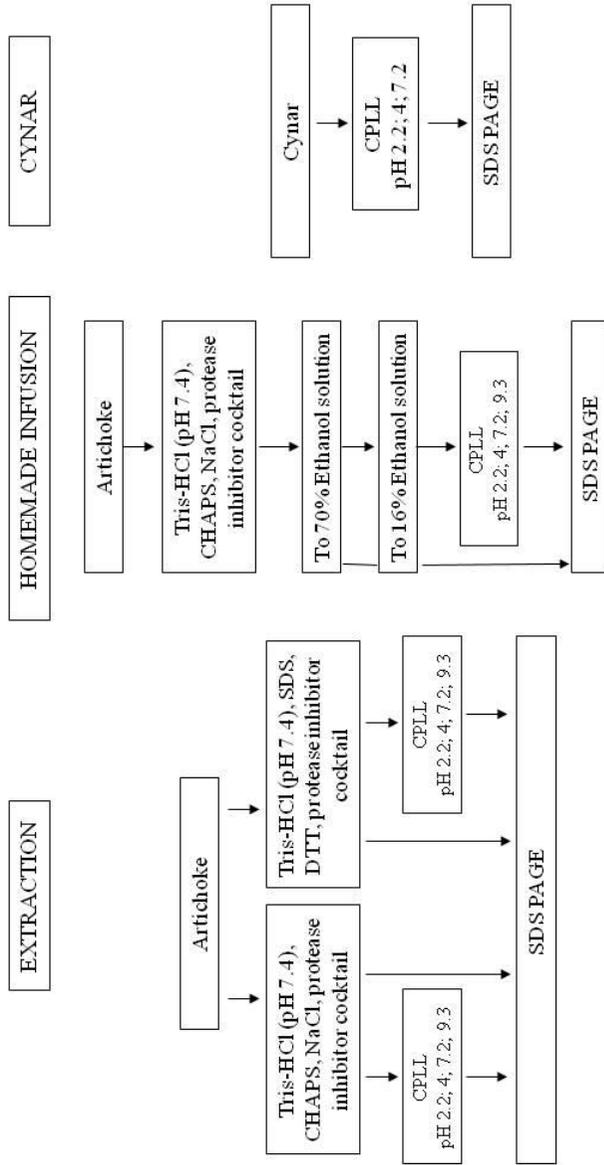


Fig 6.1. Method scheme of artichoke protein extraction, of home-made infusion preparation and CPLLs captures

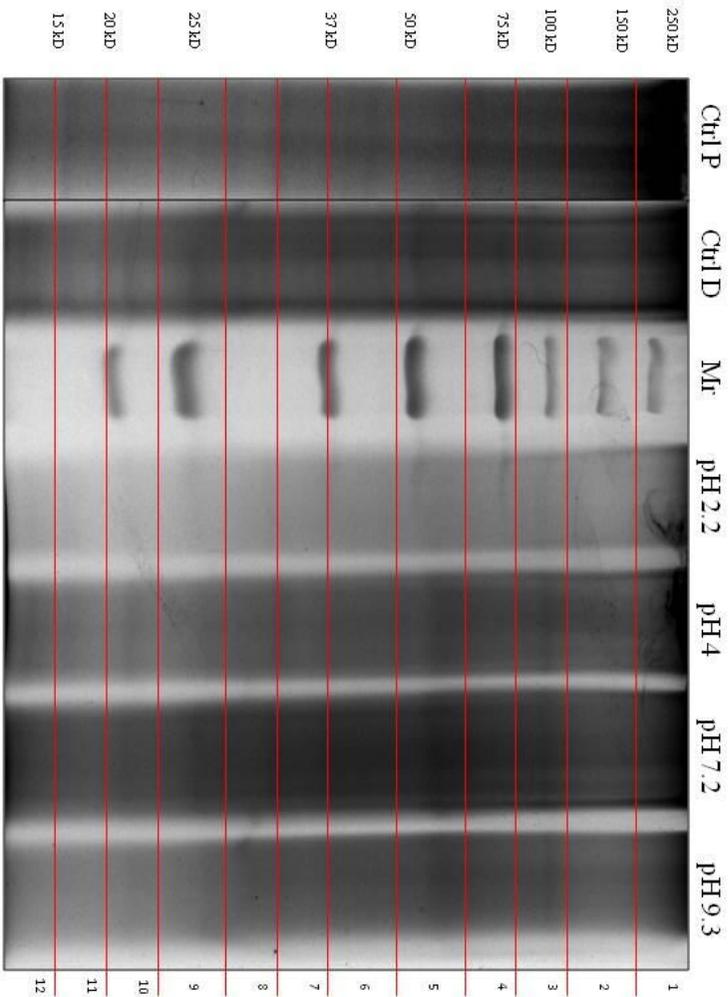


Fig 6.2. SDS- PAGE profiling of two untreated samples (in physiological conditions, CtrlP, and in denaturing buffer, Ctrl D) four eluates from denaturing extraction CPLs capture, showing 12 cut slices for MS analysis.

In general, the extraction in denaturing conditions was able to solubilize more proteins than the native one. In fact the denaturing control was characterized by a major number of protein bands and for this reason we have considered only MS protein identifications from denaturing samples. From left to right the lanes of controls for both extractions and of CPLL eluates obtained at pH 2,2; 4,0; 7,2 and 9,3 for denaturing extraction, are reported. Although all eluates were characterized by smeared profiles probably due to polymeric material in the vegetable extracts, present also in the controls, an enrichment of species was demonstrated by an increased number of protein bands from 100 kDa to 25 kDa. This enrichment was also confirmed by nLC-MS/MS analysis: Supplementary Table 1 and Supplementary Table 2 [41] list all identified proteins, together with Mascot score, molecular mass, number of unique peptides, all the contained peptide signals, peptide sequences, ion score, variable modification and mass errors. The total results in terms of identifications are shown in the Venn diagram (Fig. 6.3): a grand total of 876 proteins were tentatively assigned. Moreover it can be appreciated that the various captures with CPLLs have permitted the identification of 479 unique gene products that could not be found via conventional solubilization protocols. Also for artichoke proteome investigation the experiments have confirmed the literature data where, typically, 300 to 600 more species could be detected after CPLL treatment [25, 26, 28, 42]. The second Venn diagram (Fig. 6.4) summarises the MS data obtained considering the specific captures for different pH values of CPLLs incubations: the pH 2,2 capture permitted to reveal a total of 49 species while the pH 4,0 gave 136 unique gene products, the capture at pH 7,2 a total of 114 proteins and at pH 9,3 an amount of 99 species. It suggest that the contribution of each CPLLs incubation was fundamental for more in depth proteome analysis because different capturing pHs contributed to specific optimal conditions for interaction of the hexapeptide ligands with their partner proteins. In fact hydrophobic interactions were favoured by low pH, whereas the hydrophilic ones increased at progressively higher pH values. The recently introduced CPLL treatment at

pH 2,2 has in fact tried to simulate reverse-phase chromatography, where protein capture occurs in general at strongly acidic pH values (pH 2,2) in presence of 0,1% TFA as an ion-pairing agent [43]. Also in the SDS-PAGE profiles of home-made infusion, there was an enrichment of protein contents in eluates after CPPLs incubations (Fig. 6.5). CPPLs worked quite well in the detection of the residual artichoke proteome present in our home-made infusion, while the absence of protein bands in Italian liqueur “Cynar” was absolutely unexpected. It could be due to the extreme low content or to the lack of natural vegetable extracts used during the industrial production: only a smeared lane was stained by Colloidal Coomassie blue, probably due to the presence of sweeteners or other possible synthetic components. Also for this gel, several slices were cut and the resulting peptides from trypsin digestion were analyzed by nLC-MS/MS, but no single identification issued, although five different bottles were analysed and the potential proteins present in Cynar extracted from as much as 1 liter of beverage. Artichoke proteins were identified only in the home-made infusion after CPPLs treatments: the various captures have permitted the identification of 18 unique gene products (Table 6.1); although a grand total of 88 unique gene products were indeed detected, but we chose to exclude all IDs obtained with a single peptide, due to considerably higher error in identifications) [50]. Finally, Gene Ontology (GO) analysis was performed by filtering the found accession numbers against the QuickGO protein database. The resulting statistics, consisting in the percentage of accession numbers related to each GO category, were plotted on a pie chart (Fig 6.5). The main GO categories enriched were related to oxidation-reduction process, ribulose-biphosphate carboxylase activity, magnesium ion binding, ATP binding, and carbon fixation.

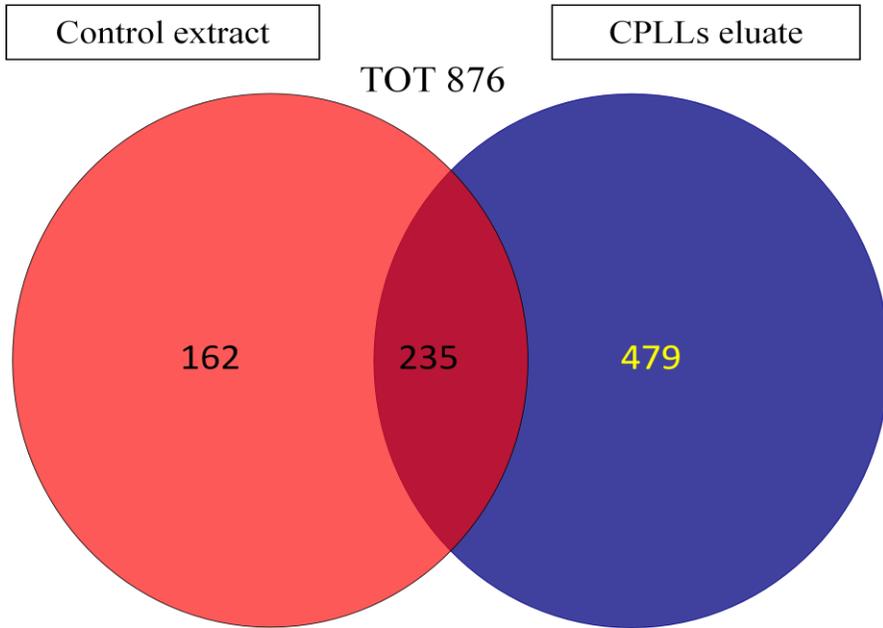


Fig. 6.3. Venn diagram of total protein identified in Artichoke: CPLL captures permitted the additional identification of 479 proteins.

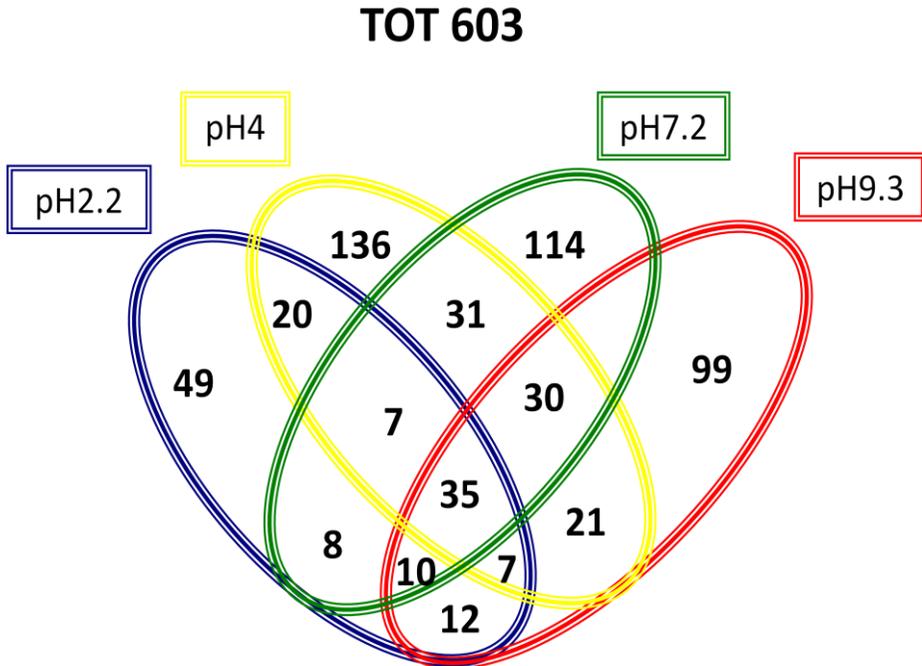


Fig. 6.4. Venn diagram of eluates from denaturing extraction CPLLs capture.

6.4. Discussion

6.4.1. On the artichoke proteome

Previous investigations have been focused on artichoke components connected with specific properties like hypocoesterolemic and antioxidant functions [10], gastric cytoprotective action [20] and antifungal activity [14]. This article, on the contrary, aims at providing an experimental procedure permitting the investigation of the entire artichoke proteome, comprising not just the well-known abundant proteins but also many trace species escaping detection because hidden by the concentrated ones. So the principal purpose is to give an exhaustive list of unique gene products, which could be useful for the exploration of artichoke functions in human health. In a recent study [44], a new protein extraction method was tested to reduce sample complexity and it was based on PEG fractionation [45], with an extra step of TCA/MeOH [46] to remove interfering compounds.

Acquadro *et al.* [44] have applied this protocol to remove RuBisCO, but even if the protein elimination was successful, allowing the detection of some low-abundance species, this procedure was very laborious and the precipitation steps would represent a possible cause of material losses. In addition, their overall discovery was quite meagre (40 total proteins) as compared with the present investigation (their Table 3 lists the IDs of 70 spots in their 2D map, but quite a number of them are isoforms of the same protein species; e.g., dihydrolipoamide dehydrogenase precursor was found in no less than ten different spots). In a more recent article [50] they did fare better, and reported identification of 119 unique gene products, still a far cry from the 876 species here described. Thus, for this reason we have decided to apply the technology of CPLs in order to prevent any material loss. As reported in literature [35], CPLs were successfully used in the investigation of vegetable proteomes: in the case of spinach leaves, CPLs have reduced the signals of high-abundance proteins like RuBisCO and enhanced trace proteins in order to identify all species by nLC-MS/MS analysis. The idea, developed in this

Table 6.1. Proteomic content of home-made artichoke infusion.

Accession number	Protein name	Mascot Mr score (Da)	Num. peptides	Infusion	CPLs Infusion
sp O04997 SODCP_SOLCS	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic OS = <i>Solidago canadensis</i> var. <i>scabra</i> GN = SODCP PE = 2 SV = 1	103 22368	3	x	x
tr Q5XTZ3 Q5XTZ3_SALMI	Glycosyl hydrolase family-like protein OS = <i>Salvia miltiorrhiza</i> PE = 2 SV = 1	45 47861	2	x	x
tr Q6A1A0 Q6A1A0_HELAN	Cu/Zn superoxide dismutase (Fragment) OS = <i>Helianthus annuus</i> GN = sod1 PE = 2 SV = 1	38 20580	2	x	x
sp P04464 CALM_WHEAT	Calmodulin OS = <i>Triticum aestivum</i> PE = 1 SV = 3	436 16893	3	x	x
tr Q5PU47 Q5PU47_CHOBU	Putative actin 1 (Fragment) OS = <i>Chorispora bungeana</i> PE = 2 SV = 1	394 40336	3	x	x
tr F6ISA0 F6ISA0_CYN5C	Alkaline leaf peroxidase OS = <i>Cynara scolymus</i> GN = Prx1 PE = 2 SV = 1	217 38892	6	x	x
tr Q8LNX9 Q8LNX9_ZINEL	Pathogenesis-related protein OS = <i>Zinnia elegans</i> GN = ZePR PE = 2 SV = 1	193 17501	2	x	x
tr C1IKQ48 C1IKQ48_HELAN	Calmodulin (Fragment) OS = <i>Helianthus annuus</i> PE = 4 SV = 1	190 5738	4	x	x
tr C1E762 C1E762_MICSR	Heat shock 70 kDa protein OS = <i>Micromonas</i> sp. (strain RCC299/NOUM17) GN = HSP70H PE = 3 SV = 1	127 71727	2	x	x
tr B1PBW0 B1PBW0_GOSHI	Beta-tubulin 8 OS = <i>Gossypium hirsutum</i> PE = 2 SV = 1	119 50985	2	x	x
tr A8CYN7 A8CYN7_GERHY	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS = <i>Gerbera hybrida</i> PE = 2 SV = 1	97 18345	3	x	x
tr Q3HVP0 Q3HVP0_SOLTU	60s acidic ribosomal protein-like protein OS = <i>Solanum tuberosum</i> PE = 4 SV = 1	91 11480	2	x	x
tr B6UE07 B6UE07_MAIZE	60S acidic ribosomal protein P2A OS = <i>Zea mays</i> PE = 4 SV = 1	81 7605	2	x	x
tr Q95FQ0 Q95FQ0_9ROSI	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS = <i>Malesherbia linearifolia</i> GN = atpB PE = 3 SV = 1	76 50309	2	x	x
tr C0PQU1 C0PQU1_PICSI	Putative uncharacterized protein OS = <i>Picea sitchensis</i> PE = 2 SV = 1	68 50275	3	x	x
tr A9RZU5 A9RZU5_PHYPA	Predicted protein OS = <i>Physoomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i> GN = PHYPADRAFT_179848 PE = 3 SV = 1	61 34413	2	x	x
tr F6KNO6 F6KNO6_TAGPA	Cyclophilin 2 OS = <i>Tagetes patula</i> GN = CYP2 PE = 2 SV = 1	57 18228	3	x	x
tr P93638 P93638_MAIZE	Actin (Fragment) OS = <i>Zea mays</i> GN = MaZ63 PE = 3 SV = 1	37 37389	2	x	x

article, was to incubate artichoke extracts with CPLLs by considering the most recent experimental improvements to obtain exhaustive interactions between proteins and peptide ligands. For this reason the incubation was performed at 4 different pH values: pH influences the ionization of the ligand and ligated partners and consequently modulates such interactions. In fact any change in environmental pH affects the dissociation constant between a given peptide and the respective protein partners: for this reason globally the number of captured proteins is significantly increased when summing up the captured species at different pHs compared with species captured under neutral conditions [47]. In the Venn diagram (Fig. 6.4) different proteins were specifically found at diverse pH values and, considering the MS data, more than half of total 876 identified proteins in artichoke extracts were detected only in CPLLs eluates. This represents the most exhaustive profiling of artichoke proteome, which could be useful for the investigation of specific species. Finally, in order to group all of assigned proteins on the basis of their putative molecular functions (Fig. 6.6), it was possible to reveal that the most abundant classes were represented by proteins related with redox processes, with chloroplast biogenesis, with photosynthesis and photo-respiration processes

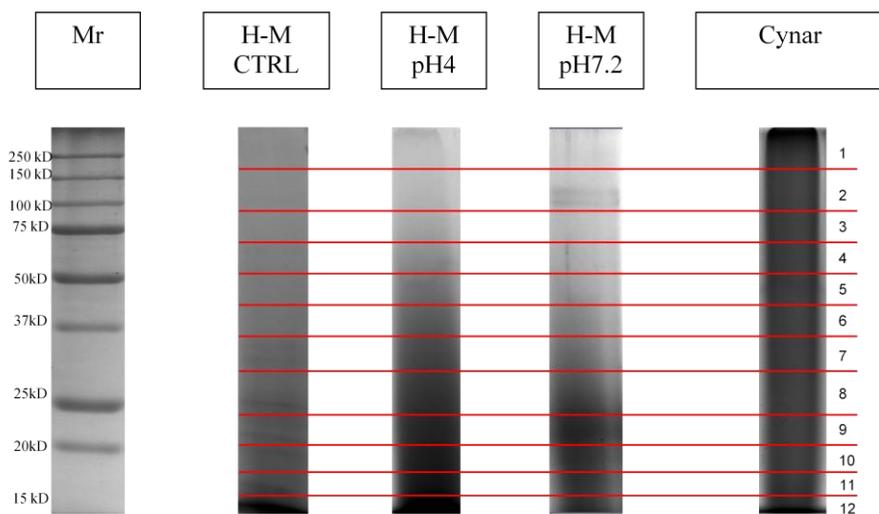


Fig. 6.5. SDS-PAGE profiles of home-made infusion and Italian liqueur, called Cynar, after library treatment, showing 12 cut slices for MS analysis.

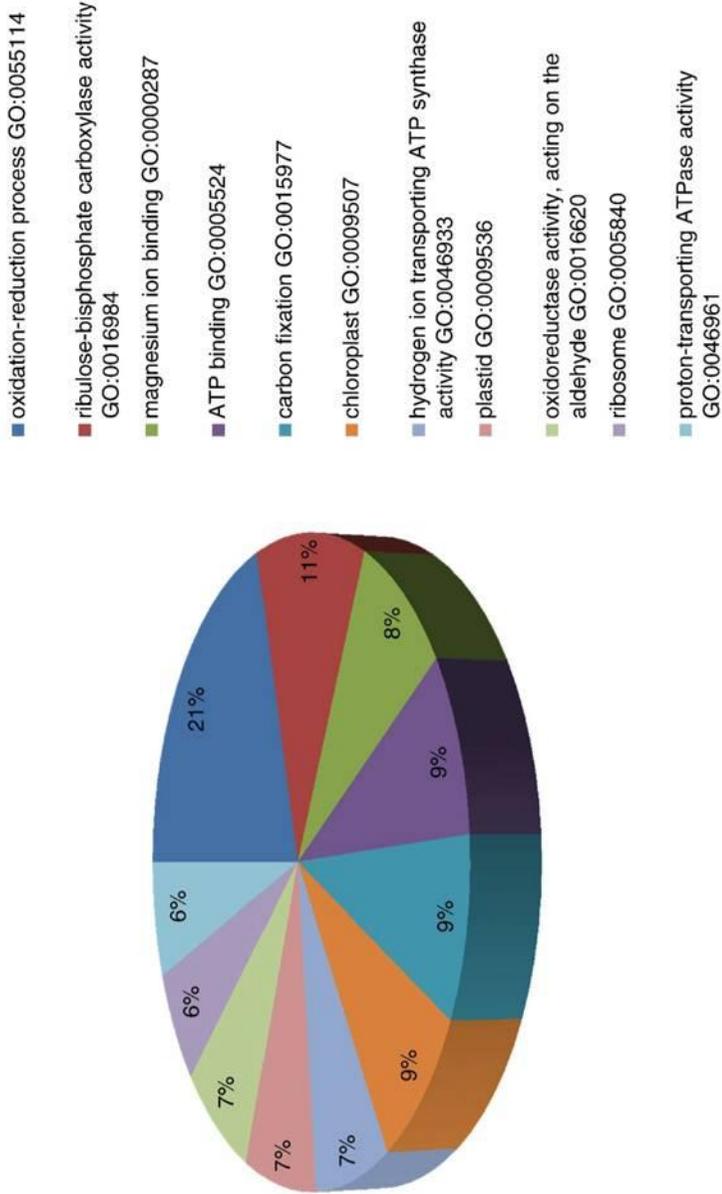


Fig 6.6. Gene Ontology (GO) functional classification of all proteins listed in the supplementary Table (876 unique gene products): 11 categories are here displayed.

This major progress, made in artichoke proteome analysis, has been possible not only by application of CPLLs technology, but also by the choice of a performant extraction buffer. In fact the denaturing conditions, obtained by using detergents like SDS, have improved protein solubilization, while the physiological buffer didn't extract the same protein content and it has shown SDS-PAGE profiles less concentrated than the corresponding ones in a denaturing environment. Despite the centrifugation and the use of polymers like 1% of polyvinylpyrrolidone (PVPP) [48], the numerous plant interfering substances couldn't be eliminated and they are responsible of smeared protein profiles in SDS-PAGE gels. A possible solution would be the protein precipitation via MeOH/chloroform or TCA/acetone protocols, which are standardized methods normally used to remove phenols and other interfering compounds. But, even if they are largely adopted, they could bring about a partial loss of extracted proteins. Therefore precipitation steps were not implemented in order to prevent any protein losses and to achieve a more complete knowledge of artichoke proteome.

6.4.2. On the Cynar proteome

Combinatorial peptide ligand library represents an efficient methodology able to interact and detect trace proteins which are often hidden by abundant ones. Moreover CPLLs could be useful also to identify proteins, extracted during the infusion process, and to investigate their functions in order to understand the declared digestive properties of a liqueur. To have an internal control, a home-made infusion was prepared by addition of 70% ethanol to a physiological artichoke extract and the final alcohol percentage was finally reduced to 16.5% in order to mimic the industrial processes. As stated in the results section, the conventional protein identification approach has allowed finding 18 unique gene products only in the home-made infusion. One of them, the ATP-synthase subunit beta has recently demonstrated to be induced by UV-C radiation, suggesting the need of maintaining photosynthesis to

retrieve ATP, whose production requires the regulation of the electron flow strictly related to the proton gradient [49]. Also heat shock protein 70, present in the home-made infusion, may interact with a wide range of Co-chaperone proteins, cooperating in the regulation of activities or in the folding of specific substrate proteins [50] or in proteins trafficking towards chloroplast. However, much to our dismay, the Cynar liqueur analysis didn't reveal any proteins although several replicates were analyzed. One experiment was even performed by using a "Cynar" bottle bought directly in a bar, in order to be sure that it was of the same quality as the supermarket product. Also in this last case, all incubations were performed at different pH values with final elution steps with the same efficient buffer as exhaustively demonstrated in literature [40], but to no avail, since not even the faintest protein traces could be detected. On the contrary, for white wine, Cereda et al. [33] were able to detect via CPLs barely 1 µg of casein per liter of wine, added as fining agent prior to bottling and commercialization of the product. So the lack of detection of any trace protein in Cynar casts some doubts on the genuineness of this product and on the claims made by the manufacturer. We suspect that the commercial liqueur might be made by using only very low amounts of natural artichoke leaves (if at all), which are replaced by synthetic flavours able to mimic the artichoke aroma, thus reducing production costs. What is also appalling is the fact that not only we could not detect any trace artichoke protein in Cynar, but also not a single protein originating from the infusion of additional 13 species of medicinal herbs, as claimed by the producer. Conversely, when we investigated the proteome of another very popular aperitif in Northern Italy, Amaro Braulio, claimed to be made with an infusion of 13 medicinal herbs grown in the mountains between 1000 to 2000 m of elevation, indeed we could identify a grand total of 76 unique gene products [36]. And we can enumerate additional examples of the ability of CPLs to detect trace proteins in other beverages. For instance, in the case of a cola drink, stated to be an extract of a Cola nut (reinforced with agave syrup) we could indeed certify the presence of just one protein of the cola nut and two

proteins of the agave, fully confirming the claims of the producer [29]. So, in conclusion, the impossibility to identify any species, by nLC-MS/MS analysis after ligand libraries treatment, strongly suggests the absence of a natural artichoke leaves infusion (including the “ghost” mixture of 13 herbs) as real components in the “Cynar” liquor.

6.5. Conclusions

In the sixties of last century a subtle propaganda was started in the TV (the very first Italian commercials, indeed) on the Cynar, showing a very famous actor, seated at a table of a bar, sipping a glass of Cynar, the message being that the herbal extract of this aperitif would sooth your nerves and allow you to survive in the midst of the most adverse conditions. May be in those days Cynar was a genuine extract of artichoke reinforced with the 13 secret herb concoction. However, our proteomic data seem to tell quite a different story, which rather unveils a scenario in which this drink, rather than being produced via genuine herb extracts, would appear to be made with synthetic chemicals and aromas.

Overall our data suggest a predominant role of CPLLs technology in the investigation of artichoke proteome as an instrument able to overcome most limits of proteomic analysis in the detection of low-abundance proteins. All identified species could be a starting point helpful to build a view of their biochemical functions connected with human health. Last but not least, combinatorial peptide ligand libraries could become an official methodology recognized in the exploration of foodstuff composition in order to verify the declared composition of products and ensure consumers' protection against any possible adulteration.

6.6. References

- [1] <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- [2] Slanina, J., Taborska, E., Musil, P., Ceska Slov Farm, 42 (1993) 265.
- [3] Gebhardt, R., Toxicol. Appl. Pharmacol., 144 (1997) 279.
- [4] Aktay, G., Deliorman D., Ergun E., Ergun F., Yesilada E. Cevik C. J. Ethnopharmacol., 73 (2000), 121.
- [5] Hoving, S., Voshol, H., van Oostrum, J., Electrophoresis, 21 (2000) 2617.
- [6] Brown, J., Rice-Evans, C., Free Rad. Res., 29 (1998) 247.
- [7] Kraft, K., Phytomedicine, 4 (1997) 369.
- [8] Pittler, M. H., Thompson, C. J., Ernst E. Cochrane Database Syst. Rev., 3 (2002) CD003335.
- [9] Bundy, R., Walker, A. F., Middleton, R.W., Wallis, C., Simpson, H.C.R., Phytomedicine, 15 (2008) 668.
- [10] Quiang, Z., Lee, S., Ye ,Z., Wu, X., Hendrich, S., Phytother. Res. (2011) DOI: 10.1002/ptr.3698.
- [11] McDougall, B., King, P., Wu, B., Hostomsky, Z., Reinecke, M., Robinson, E., Jr. Antimicrob. Agents Chemoter. 42 (1998) 140.
- [12] Slanina, J., Táborská, E., Bochořáková, H., Slaninová, I., Humpa, O., Robinson, Jr.. W. E., Schram, K.H., Tetrahedron Lett., 42 (2001) 3383.
- [13] Zhu, X., Zhang, H., Lo, R., J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 7272.
- [14] Zhu, X., Zhang, H., Lo R., Fitoterapia 76 (2005) 108.
- [15] Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., Cardinali, A., J. Funct. Foods, 1 (2009) 131.
- [16] Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q.-Y., Tadmor, Y., J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 601.
- [17] Fritsche J., Beindorff C., Dachtler M., Zhang H, Lammers J.G., Eur. Food Res. Technol. 215 (2002) 149.

- [18] Azzini, E., Bugianesi, R., Romano, F., Di Venere, D., Miccadei, S., Durazzo, A., Foddai, M.S., Catasta, G., Linsalata, V., Maiani, G., *Br. J. Nutr.* 97 (2007) 963.
- [19] Cho, J. Y., Baik, K. U., Jung, J. H., Park, M. H., *Eur. J. Pharmacol.*, 398 (2000) 399.
- [20] Ishida, K., Kojima, R., Tsuboi, M., Tsuda, Y., Ito M., *Biol.Pharm.Bull.* 33 (2010) 223.
- [21] Holtmann, G., Adam, B., Haag, S., Collet, W., Grunewald, E., Windeck, T., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 18 (2003) 1099.
- [22] Cardinali, A., Sergio, L., Di Venere, D., Linsalata, V., Fortunato, D., Conti, A., Lattanzio, V., *J. Sci. Food Agr.*, 87 (2007) 1417.
- [23] Castagna, A., Cecconi, D., Sennels, L., Rappsilber, J., Guerrier, L., Fortis, F., Boschetti, E., Lomas, L., Righetti, P. G., *J. Proteome Research* 4 (2005) 1917.
- [24] Roux-Dalvai, F., Gonzalez de Peredo, A., Simó, C., Guerrier, L., Bouyssié, D., Zanella, A., Citterio, A., Burlet-Schiltz, O., Boschetti, E., Righetti, P.G., Monsarrat. B., *Mol Cell Proteomics* 7 (2008) 2254.
- [25] Righetti, P.G., Boschetti, E., *Mass Spectrom Rev*, 27 (2008) 596.
- [26] Righetti, P.G., Boschetti, E., Kravchuk, A.V., Fasoli, E., *Expert Rev Proteomics*, 7 (2010) 373.
- [27] Righetti, P.G., Fasoli, E., Boschetti, E., *Electrophoresis*, 32 (2011) 960.
- [28] Fasoli, E., D'Amato, A., Kravchuk, A.V., Citterio, A., Righetti, P.G., *J. Proteomics*, 74 (2011) 1080.
- [29] D'Amato, A., Fasoli, E., Kravchuk, A.V., Righetti, P.G., *J. Proteome Res*, 10 (2011) 2684.
- [30] Di Girolamo, F., D'Amato, A., Righetti, P.G., *J. Proteomics*, 75 (2011) 718.
- [31] D'Amato, A., Fasoli, E., Kravchuk, A.V., Righetti, P.G., *J Proteome Res*, 10 (2011) 3789.
- [32] Fasoli, E., Aldini, G., Regazzoni, L., Kravchuk, A.V., Citterio, A., Righetti P.G., *J. Proteome Res*, 9 (2010) 5262.

- [33] Cereda, A., Kravchuk, A.V., D'Amato, A., Bachi, A., Righetti, P.G., J. Proteomics, 73 (2010) 1732.
- [34] D'Amato, A., Kravchuk, A.V., Bachi, A., Righetti, P.G., J. Proteomics, 73 (2010) 2370.
- [35] Fasoli, E., D'Amato, A., Kravchuk, A.V., Boschetti, E., Bachi, A., Righetti, P.G., J. Proteomics, 71 (2011) 127.
- [36] Fasoli, E., D'Amato, A., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteomics., 75 (2012) 3374.
- [37] Fasoli, E., D'Amato, A., Citterio, A., Righetti, P.G., J. Proteomics. 75 (2012) 1960.
- [38] Fonslow, B.R., Carvalho, P.C., Academia, K., Freeby, S., Xu, T., Nakorchevsky, A., et al. J Proteome Res, 10 (2011) 3690.
- [39] Fasoli E, Farinazzo A, Sun CJ, Kravchuk AV, Guerrier L, Fortis F, et al. J Proteomics, 73 (2010) 733.
- [40] Candiano, G., Dimuccio, V., Bruschi, M., Santucci, L., Gusmano, R., Boschetti, E., et al., Electrophoresis, 30 (2009):2405.
- [41] Saez, V., Fasoli, E., D'Amato, A., Simó-Alfonso, E., Righetti, P. G., Biochimica et biophysica acta, 1834 (2013) 119 (Online version).
- [42] Boschetti, E., Righetti, P.G., Proteomics, 9 (2009) 1492.
- [43] Hearn, M.T.W., In: Janson JC, Rydén L, editors. Protein Purification. New York: Wiley-VCH; (1998) 239.
- [44] Acquadro, A., Falvo, S., Mila, S., Giuliano Albo, A., Moglia, A., Lanteri, S., Electrophoresis, 30 (2009) 1594.
- [45] Kim, S., Cho, K., Jang, Y., Kang, K., Electrophoresis, 22 (2001) 2103.
- [46] Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., Electrophoresis, 7 (1986) 52.
- [47] Fasoli, E., Farinazzo, A., Sun, C.J., et al. J. Proteomics 73 (2010) 733.
- [48] Magalhães, P.J., Vieira, J.S., Gonçalves, L.M., Pacheco, J.G., Guido, L.F., Barros, A.A. J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 3258.
- [49] Falvo, S., Di Carli, M., Desiderio, A., Benvenuto, E., Moglia, A., America, T., Lanteri, S., Acquadro, A., Proteomics, 12 (2012) 448.

- [50] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., Trends Plant Sci., 9 (2004) 244.
- [51] Omenn, J.S., States, D.J., Adamski, M., Blackwell, T.W., Menon, R., Hermjakob, H., et al. Proteomics 5 (2005) 3226.

BLOQUE IV.
CONCLUSIONES FINALES

En la presente Tesis se ha descrito el desarrollo de procedimientos de síntesis de biodiésel utilizando metanol supercrítico para poder procesar materias primas de distinta calidad que permitan obtener un biocombustible con alto rendimiento y de calidad. Para ello, se ha abordado el estudio de distintos aspectos relacionados (diseño de reactor, estudio de condiciones experimentales, estabilidad térmica de los FAMEs, etc.) con el proceso supercrítico para poder analizar así la factibilidad técnica y económica de la metodología propuesta. Se ha demostrado que los procedimientos propuestos, con metanol en estado supercrítico, toleran niveles altos de FFA en las materias primas, lo cual permite procesar materias primas de baja calidad, mucho más baratas, reduciendo, por tanto, el coste final de producción del biodiésel. Otro de los aspectos tratados en esta Tesis es el estudio del proteoma de la alcachofa y los licores derivados de ésta mediante el uso de CPLs y su aplicación con fines de autenticación.

En este bloque de la tesis, y según lo estipulado en la reglamentación de Tesis Doctorales de la Universidad de Valencia, se resumen las conclusiones más relevantes de los Capítulos 3-6. Dicho resumen se ha estructurado en dos partes (I y II), en consonancia con lo expuesto en la Memoria.

Parte I. Producción de biodiésel en condiciones supercríticas

I.1. Producción de biodiésel en un reactor discontinuo usando condiciones supercríticas

Se ha diseñado y construido un reactor discontinuo de tanque agitado de acero inoxidable y 1 L de capacidad. Éste ha sido especialmente concebido para evaluar de forma sencilla y con un coste energético y de reactivos moderado el efecto de muy diversas condiciones de reacción sobre el biodiésel así obtenido (temperatura, tiempo, presión de la reacción, relación molar MeOH:aceite, contenido de FFAs etc.).

Con este reactor se han llevado a cabo múltiples experimentos a diferentes temperaturas y presiones de hasta 350°C y 25 MPa, respectivamente. Se ha evaluado su reproducibilidad en términos de

producción de FAMES por reacción de transesterificación (a partir de materias primas vegetales naturales como el aceite de girasol, rico en glicéridos), y también por reacción de esterificación (a partir de una mezcla sintética de FFA preparada en el laboratorio). En todos los casos se han obtenido resultados satisfactorios con coeficientes de variación inferiores al 5%, lo que demuestra la buena reproducibilidad del reactor.

Asimismo se han optimizado las condiciones de reacción para la producción de biodiésel a partir de aceite de girasol, obteniéndose unos rendimientos del 98,9% en tiempos de reacción realmente cortos (20 min). También se ha evaluado la tolerancia del proceso supercrítico al contenido de FFA en la materia prima. El rendimiento del biodiésel producido con MeOH supercrítico es cercano al 100 %, prácticamente independiente del contenido de FFA (siempre que se emplee la relación molar MeOH:aceite óptima para la muestra, según su contenido en FFA), y siempre superior al rendimiento del proceso catalítico convencional, para el que la conversión del biodiésel se reduce de forma significativa a partir de un 5-10% de FFA, y también superior al proceso de catálisis ácida y básica. Adicionalmente, los tiempos de reacción son mucho menores, y la separación y purificación del biodiésel es más sencilla.

I.2. Evaluación de la estabilidad térmica e isomerización cis-trans de FAMES mediante metanol supercrítico

Se ha llevado a cabo un estudio de estabilidad térmica del biodiésel durante su producción con MeOH supercrítico, en un reactor discontinuo de tanque agitado especialmente diseñado para este cometido, evaluando varias materias primas de diferente naturaleza (distinta composición de ácidos grasos). El estudio se ha centrado en la monitorización de la evolución de las reacciones de producción, isomerización cis-trans y descomposición de los FAMES durante su síntesis. Para seguir los cambios se ha empleado un método de GC-FID capaz de separar y cuantificar con éxito los distintos isómeros cis-trans.

La influencia del tiempo y la temperatura de reacción sobre el rendimiento y la estabilidad térmica del biodiésel han sido evaluadas. Como resultado se demuestra que ambos parámetros deben ser tenidos en cuenta para optimizar la producción de biodiésel para cada materia prima.

Los resultados demuestran que mientras el metil linoleato sufre una degradación significativa a 350°C, el metil oleato apenas se descompone a pesar de que muestra un ligero grado de isomerización cis-trans. Por esta razón, las condiciones óptimas para obtener biodiésel supercrítico a partir de aceite de oliva se hayan próximas a 330°C y 20 MPa. En cambio, si la materia prima de partida es aceite de girasol-alto oleico sería necesario rebajar la temperatura de reacción hasta los 315°C, para evitar una drástica reducción de la cantidad de FAMES insaturados por reacciones de isomerización cis-trans o descomposición térmica. Finalmente, si el objetivo es la obtención de un biodiésel de segunda generación a partir de un residuo como el aceite de cocina reciclado, la síntesis debería llevarse a cabo a temperaturas por debajo de 300°C, de nuevo para evitar las reacciones de degradación e isomerización cis-trans.

I.3. Síntesis de biodiésel de 2^a generación a través del uso del MeOH supercrítico

Se ha desarrollado un estudio para evaluar las condiciones óptimas de producción de biodiésel de 2^a generación por la vía supercrítica a partir de materias primas muy variadas, tales como grasas animales residuales, subproductos de la industria del biodiésel catalítico, ácidos grasos, aceites vegetales usados, aceite de pescado y microalgas.

Se demuestra que las condiciones de síntesis están fuertemente influenciadas por la naturaleza de la materia prima, especialmente por su

índice de acidez, que condiciona la relación molar óptima de MeOH:aceite a emplear en el proceso.

Cuando la materia prima está formada principalmente de un único componente (TG o FFAs), la relación molar óptima se acerca a la esperable para ese único componente (véase capítulo 2). En cambio, las muestras con contenidos intermedios de glicéridos y ácidos grasos presentan relaciones molares óptimas también intermedias.

Para el caso particular de las materias primas con elevado número de PUFAs (como los aceites de pescado o las algas) la síntesis en condiciones supercríticas conduce a una pérdida de un número muy elevado de FAMES (de un 15 a un 35%), aunque por otra parte se trata de ésteres poliinsaturados que en caso de conservarlos en el biodiésel, causarían más problemas del que supondría su pérdida, por la gran cantidad de antioxidantes que se necesitarían para lograr que dicho biodiésel cumpliera normativa de estabilidad a la oxidación. Como solución económica y ecológica, se propone realizar un tratamiento previo de extracción de dichos PUFAs, puesto que presentan un elevado valor añadido que a seguramente podrá ser aprovechado en otro mercado, favoreciendo al tiempo el máximo aprovechamiento de los recursos.

Parte II. Caracterización de bebidas alcohólicas mediante técnicas analíticas de elevada resolución

II. Caracterización del proteoma de alcachofa y licor Cynar

Se ha caracterizado el proteoma de la alcachofa así como extractos derivados de ésta (infusión y licor comercial) aplicando técnicas de aislamiento novedosas como son las CPLs, las cuales permiten extraer de manera eficiente proteínas presentes en bajas concentraciones. Para ello, se optimizó la extracción de las proteínas en las muestras de interés empleando diferentes bibliotecas comerciales y fabricadas en el laboratorio del Prof. Righetti (Politécnico de Milán) a diferentes pHs. Tras la elución de las proteínas empleando un tampón que contenía SDS, y su posterior análisis por MS condujo a la identificación de 876 proteínas en los extractos de alcachofa,

18 proteínas en una infusión a partir de sus hojas, y ninguna en el licor Cynar. Así pues, la aplicación de las técnicas proteómicas desarrolladas no solamente ha permitido la identificación de un elevado número de proteínas, y así obtener una visión más amplia del proteoma en este tipo de matrices, sino además poder establecer, en base a los perfiles proteicos, criterios de autenticidad y de evaluación del origen natural de bebidas comerciales derivadas de extractos del vegetal a estudiar.

