

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR
DE GLICEROL: DESARROLLO DE
CATALIZADORES INORGÁNICOS Y
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Lic. Esteban Andrés Sanchez

Director de Tesis: Ing. Raúl A. Comelli

Co-director de Tesis: Dr. Alejandro J. Beccaria

Lugar de realización:

Laboratorio 67 – Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica –

Facultad de Ing. Química – Universidad Nacional del Litoral / CONICET

Laboratorio de Fermentaciones – Facultad de Bioquímica y Ciencias

Biológicas – Universidad Nacional del Litoral

-2015-

Quiero expresar mis agradecimientos...

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por brindarme la oportunidad de realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas y brindarme sus instalaciones para desempeñar las actividades de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar la realización de este estudio, otorgando las becas de posgrado Tipo I y II.

Al Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica - INCAPE "José Miguel Parera" y la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por brindar sus instalaciones para el desarrollo de las actividades de esta tesis.

Al Ing. Raúl A. Comelli y al Dr. Alejandro Beccaria, por haber aceptado el compromiso de guiarme durante el desarrollo de esta tesis y por los conocimientos impartidos, además de su constante interés en mi desarrollo como persona.

A Miguel A. D'Angelo, por su constante colaboración y apoyo con este grupo, y por mantener en todo momento un excelente ambiente de trabajo.

A los investigadores de INCAPE, FIQ y FBCB, quienes gentilmente ofrecieron sus conocimientos para el aprendizaje de diferentes técnicas y metodologías, contribuyendo en gran medida al desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio 67 (INCAPE) y del Laboratorio de Fermentaciones (FBCB), por brindar un agradable entorno de trabajo.

A mis amigos de Escuela Secundaria, Facultad y Posgrado, por hacerme entender que lo más importante no sólo se encuentra en el ámbito académico.

A Carina, mi novia, por ser responsable de que estos años hayan sido los mejores y más importantes de mi vida, haciéndome una persona muy feliz.

A la familia de mi novia, quienes siempre estuvieron presentes brindando todo su afecto y apoyo, haciéndome realmente sentir como un integrante más.

Y, principalmente, a mi familia, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible, y porque siempre han ofrecido su incondicional apoyo durante toda mi vida.

Porque mis logros también son suyos...

La presente tesis permitió contribuir al ambiente científico y académico mediante los siguientes artículos y presentaciones:

PUBLICACIONES INTERNACIONALES

- **Hydrogen Production From Glycerol on Ni/Al₂O₃ Catalyst.** Esteban A. Sanchez, Miguel A. D'Angelo, Raúl A. Comelli. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (2010) 5902-5907.
- **Hydrogen by Glycerol Steam Reforming on a Nickel-Alumina Catalyst: Deactivation Processes and Regeneration.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (2012) 14740-14746.
- **Hydrogen Production by Glycerol Steam-Reforming over Nickel and Nickel-Cobalt Impregnated on Alumina.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (2014) 8650-8655.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- **Desarrollo de catalizadores para la producción de hidrógeno a partir de glicerol.** Esteban A. Sanchez, Miguel A. D'Angelo, Raúl A. Comelli. 3º Congreso Nacional y 2º Congreso Iberoamericano - Hidrógeno y Fuentes Sustentables de Energía. *San Juan, Argentina*. 08 al 12 de junio de 2009. [Póster](#).
- **Valorization of glycerol, by-product of biodiesel: Production of added-value chemical compounds by catalytic way.** Ignacio Eberhardt, Esteban A. Sanchez, Sebastián Antuña, Miguel A. D'Angelo, Raúl A. Comelli. 15º Congresso Brasileiro de Catálise y 5º Congresso de Catálise do Mercosul. *Buzios, Brasil*. 13 al 17 de septiembre de 2009. [Póster](#).
- **Desarrollo de catalizadores para la producción de hidrógeno a partir de glicerol.** Esteban A. Sanchez. XIII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL y IV Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. *Santa Fe, Argentina*. 19 al 20 de noviembre de 2009. [Póster](#).

- **Desarrollo de catalizadores de Ni soportado sobre alúmina para la producción de hidrógeno a partir de glicerol.** XXII Congreso Iberoamericano de Catálisis. Esteban A. Sanchez, Miguel A. D'Angelo, Raúl A. Comelli. *Cón-Cón, Chile*. 05 al 10 de septiembre de 2010. [Póster](#).
- **Desarrollo de catalizadores de Ni soportado sobre alúmina para la producción de hidrógeno a partir de glicerol.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. XXVIII Congreso Argentino de Química y 4º Workshop de Química Medicinal. *Lanús, Argentina*. 13 al 16 de septiembre de 2010. [Póster](#).
- **Producción de hidrogeno por reformado en fase gas de glicerol sobre catalizadores de níquel soportado sobre alúmina.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. VI Congreso Argentino de Ingeniería Química. *Mar del Plata, Argentina*. 26 al 29 de septiembre de 2010. [Póster](#).
- **Desarrollo de catalizadores de níquel soportado sobre alúmina para la producción de hidrógeno a partir de glicerol.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. *Santa Fe, Argentina*. 19 al 21 de octubre de 2010. [Oral](#).
- **Producción de hidrógeno por reformado en fase gas de glicerol: estabilidad de catalizadores Ni-alúmina.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. 4º Congreso Nacional y 3º Congreso Iberoamericano - Hidrógeno y Fuentes Sustentables de Energía. *Mar del Plata, Argentina*. 06 al 09 de junio de 2011. [Póster](#).
- **Estudio del proceso de desactivación de níquel impregnado sobre alúmina durante la producción de hidrógeno por reformado de glicerol en fase gas.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. XVII Congreso Argentino de Catálisis y VI Congreso de Catálisis del Mercosur. *Salta, Argentina*. 17 al 20 de octubre de 2011. [Póster](#).
- **Procesos de desactivación y regeneración de Ni/Al₂O₃ durante la producción de hidrógeno por reformado con vapor de glicerol.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. XXIII Congreso Iberoamericano de Catálisis. *Santa Fe, Argentina*. 02 al 07 de septiembre de 2012. [Oral](#).

- **Estudio de la desactivación y regeneración de Ni/Al₂O₃ durante el reformado con vapor de glicerol para la producción de hidrógeno.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. XXIX Congreso Argentino de Química. *Mar del Plata, Argentina*. 03 al 05 de octubre de 2012. [Póster](#).
- **Producción de bio-hidrógeno a partir de glicerol empleando catalizadores inorgánicos y biológicos.** Esteban A. Sanchez, Alejandro J. Beccaria, Raúl A. Comelli. V Encuentro Regional de Biotransformación y Biotransformaciones. *La Plata, Argentina*. 05 al 08 de noviembre de 2012. [Oral](#).
- **Hidrógeno por reformado en fase gas de glicerol empleando catalizadores de níquel y níquel-cobalto sobre alúmina.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. 5º Congreso Nacional y 4º Congreso Iberoamericano - Hidrógeno y Fuentes Sustentables de Energía. *Córdoba, Argentina*. 10 al 14 de junio de 2013. [Póster](#).
- **Evaluación de catalizadores de níquel-cerio sobre alúmina para la obtención de gas de síntesis por reformado en fase gas de glicerol.** Juan A. Sánchez, Agustín A. Sabbione, Esteban A. Sanchez. XVII Encuentro Jóvenes Investigadores de la UNL. *Santa Fe, Argentina*. 04 al 05 de septiembre de 2013. [Póster](#).
- **Caracterización de cultivos de una cepa de *Escherichia coli* promisorio para la producción de hidrógeno a partir de glicerol crudo.** Esteban A. Sanchez, Pablo C. Giordano, Thomas K. Wood, Raúl A. Comelli, Alejandro J. Beccaria. XIII Congreso Argentino de Microbiología y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. *Buenos Aires, Argentina*. 23 al 26 de septiembre de 2013. [Oral](#).
- **Evaluación de catalizadores de níquel y níquel-cobalto sobre alúmina para la producción de hidrógeno por reformado en fase gas de glicerol.** Esteban A. Sanchez, Raúl A. Comelli. XVIII Congreso Argentino de Catálisis. *San Luis, Argentina*. 30 de octubre a 01 de noviembre de 2013. [Oral](#).
- **Reformado en fase gas del glicerol empleando catalizadores de níquel y níquel-cerio impregnados sobre alúmina.** Esteban A. Sanchez, Juan A. Sánchez, Agustín A. Sabbione, Pablo C. Giordano, Raúl A. Comelli. XXIV Congreso Iberoamericano de Catálisis. *Medellín, Colombia*. 15 al 19 de septiembre de 2014. [Póster](#).

- **Optimization of *Escherichia coli* cultures for hydrogen production from crude glycerol.** Esteban A. Sanchez, Thomas K. Wood, Raúl A. Comelli, Alejandro J. Beccaria. VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations y 1º Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. *Buzios, Brasil*. 23 al 26 de septiembre de 2014. [Póster](#).

Índice de Contenidos

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
RESUMEN	XXIV
CAPÍTULO 1: PRESENTACIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Objetivos	5
<i>1.2.1 Objetivo general</i>	5
<i>1.2.2 Objetivos específicos</i>	5
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN	6
2.1 Combustibles fósiles	7
2.2 Energías alternativas y biomasa	11
2.3 Biocombustibles y biodiesel	13
2.4 Glicerol	17
2.5 Hidrógeno	21
2.6 Gas de síntesis	25
2.7 Procesos químicos	28
<i>2.7.1 Electrólisis</i>	28
<i>2.7.2 Foelectrólisis</i>	29
<i>2.7.3 Termólisis</i>	29
2.8 Procesos catalíticos	30
<i>2.8.1 Pirólisis</i>	30
<i>2.8.2 Gasificación</i>	31
<i>2.8.3 Oxidación parcial (POX)</i>	32

2.8.4	<i>Reacción de Intercambio gas-vapor de agua (WGS)</i>	32
2.8.5	<i>Oxidación preferencial (PROX)</i>	33
2.8.6	<i>Reformado en agua supercrítica (SCW)</i>	33
2.8.7	<i>Reformado autotérmico (ATR)</i>	35
2.8.8	<i>Reformado en fase líquida (APR)</i>	36
2.8.9	<i>Reformado en fase gas (SR)</i>	39
2.8.9.1	<i>Reformado en fase gas de combustibles fósiles</i>	39
2.8.9.2	<i>Reformado en fase gas de glicerol</i>	41
2.8.9.2.1	<i>Principales reacciones</i>	41
2.8.9.2.2	<i>Depósitos de carbón</i>	44
2.8.9.2.3	<i>Soportes y metales</i>	46
2.8.9.2.4	<i>Agregado de promotores</i>	48
2.9	Procesos biológicos	51
2.9.1	<i>Biofotólisis directa</i>	54
2.9.2	<i>Biofotólisis indirecta</i>	55
2.9.3	<i>Fotofermentación</i>	56
2.9.4	<i>Reacción de intercambio gas-vapor de agua</i>	57
2.9.5	<i>Fermentación</i>	57
2.9.5.1	<i>Cultivos poliaxénicos</i>	58
2.9.5.2	<i>Cultivos axénicos</i>	61
2.9.5.2.1	<i>Microorganismos de ambientes salinos</i>	61
2.9.5.2.2	<i>Microorganismos del género Clostridium</i>	62
2.9.5.2.3	<i>Microorganismos de la familia Enterobacteriaceae</i>	63
2.9.5.2.3.1	<i>Los géneros Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella</i>	63
2.9.5.2.3.2	<i>El género Escherichia</i>	65
2.9.6	<i>Quimiometría</i>	71
2.9.6.1	<i>Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)</i>	73
2.9.6.2	<i>Función Deseabilidad</i>	74
	CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	78
3.1	Procesos catalíticos	79
3.1.1	<i>Preparación de catalizadores</i>	79
3.1.1.1	<i>Acondicionamiento del soporte</i>	79

3.1.1.2	<i>Preparación de las soluciones de metales</i>	79
3.1.1.3	<i>Impregnación del soporte</i>	80
3.1.1.4	<i>Pretratamiento del material impregnado</i>	81
3.1.2	<i>Caracterización físicoquímica de materiales</i>	81
3.1.2.1	<i>Espectroscopía de Emisión Óptica por Plasma Inductivo</i>	81
3.1.2.2	<i>Adsorción física de N₂</i>	82
3.1.2.3	<i>Difracción de Rayos X (DRX)</i>	82
3.1.2.4	<i>Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)</i>	83
3.1.2.5	<i>Reducción a Temperatura Programada (RTP)</i>	83
3.1.3	<i>Evaluación catalítica en reformado en fase gas del glicerol</i>	84
3.1.3.1	<i>Sistema de reacción</i>	84
3.1.3.2	<i>Seguimiento de la reacción</i>	87
3.1.3.3	<i>Cuantificación de resultados</i>	88
3.1.3.4	<i>Cálculo de parámetros</i>	91
3.1.4	<i>Evaluación catalítica durante actividad prolongada</i>	95
3.1.4.1	<i>Etapas de desactivación</i>	95
3.1.4.2	<i>Ensayos de regeneración</i>	95
3.1.4.3	<i>Cuantificación de resultados</i>	96
3.1.4.4	<i>Cálculo de parámetros</i>	96
3.1.5	<i>Análisis del depósito carbonoso generado</i>	96
3.1.5.1	<i>Oxidación a temperatura programada (OTP)</i>	96
3.2	Sistemas biológicos	98
3.2.1	<i>Cepas bacterianas</i>	98
3.2.1.1	<i>Características de las cepas</i>	98
3.2.1.2	<i>Mantenimiento de las cepas</i>	98
3.2.2	<i>Diseño experimental</i>	99
3.2.3	<i>Ensayos de asimilación de glicerol y producción de H₂</i>	99
3.2.3.1	<i>Sistemas de fermentación</i>	99
3.2.3.2	<i>Medios de cultivo</i>	102
3.2.3.3	<i>Preparación del inóculo y condiciones de cultivo</i>	104
3.2.4	<i>Determinaciones analíticas</i>	105
3.2.4.1	<i>Cuantificación de biomasa</i>	105
3.2.4.2	<i>Cuantificación de glicerol en las muestras líquidas</i>	105

3.2.4.3	<i>Cuantificación de analitos en la fracción gaseosa</i>	106
3.2.5	<i>Cálculo de parámetros de cultivo</i>	107
3.2.5.1	<i>Parámetros cinéticos</i>	107
3.2.5.2	<i>Parámetros estequiométricos</i>	107
CAPÍTULO 4:	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
4.1	Procesos catalíticos	110
4.1.1	<i>Caracterización fisicoquímica de materiales</i>	110
4.1.1.1	<i>Espectroscopía de emisión óptica por plasma inductivo</i>	110
4.1.1.2	<i>Adsorción física de N₂</i>	110
4.1.1.3	<i>Difracción de rayos X</i>	113
4.1.1.4	<i>Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier</i>	116
4.1.1.5	<i>Reducción a temperatura programada</i>	117
4.1.2	<i>Evaluación catalítica en reformado en fase gas del glicerol</i>	120
4.1.2.1	<i>Catalizadores de Níquel-Cobalto</i>	121
4.1.2.1.1	<i>Distribución de productos</i>	121
4.1.2.1.2	<i>Parámetros obtenidos</i>	127
4.1.2.1.3	<i>Depósitos de carbón</i>	129
4.1.2.2	<i>Catalizadores de Níquel-Cerio</i>	133
4.1.2.2.1	<i>Distribución de productos</i>	133
4.1.2.2.2	<i>Parámetros obtenidos</i>	138
4.1.2.2.3	<i>Depósitos de carbón</i>	141
4.1.3	<i>Evaluación catalítica durante actividad prolongada</i>	144
4.1.3.1	<i>Experiencias de desactivación</i>	144
4.1.3.1.1	<i>Distribución de productos</i>	144
4.1.3.1.2	<i>Parámetros obtenidos</i>	149
4.1.3.1.3	<i>Depósitos de carbón</i>	151
4.1.3.2	<i>Ensayos de regeneración</i>	152
4.2	Sistemas biológicos	154
4.2.1	<i>Caracterización de las cepas de E. coli</i>	154
4.2.2	<i>Selección del rango de concentraciones de glicerol</i>	160
4.2.3	<i>Reoptimización de un medio de cultivo</i>	161
4.2.4	<i>Verificación experimental</i>	167

<i>4.2.5 Cultivo en biorreactor tanque agitado</i>	168
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	173
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	178

Símbolos y abreviaturas

ABREV.	DESCRIPCIÓN
$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	Gamma-alúmina
λ	Longitud de onda
μ	Velocidad específica de crecimiento
1, 2-PDOL	1, 2-propanodiol
1, 3-PDOL	1, 3-propanodiol
2-HEtAL	2-Hidroxietanal
2,3-DHPAL	2,3-Dihidroxiopropanal
Ac	Acetona
APR	Reformado en fase líquida (siglas en inglés)
ATP	Adenosín Trifosfato
ATR	Reformado Autotérmico (siglas en inglés)
B5	Cantidad de biodiésel agregado al diésel (en este caso, 5%)
C₂	Átomos de carbono del hidrocarburo (en este caso, 2 átomos)
CCD	Detector de carga acoplada (siglas en inglés)
C_{CON}	<i>E. coli</i> BW25113 frdC
CENACA	Centro Nacional de Catálisis
CFM	Controlador de flujo másico electrónico
C_{HW2}	<i>E. coli</i> HW2
COV	Compuestos orgánicos volátiles
D.E.	Diámetro externo
D.I.	Diámetro interno
DCC	Diseño Central Compuesto
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DLATGS	Detector de temperatura controlada de alta sensibilidad (siglas en inglés)
DM_P	Diámetro medio de poros
d_{NiO}	Diámetro promedio de los cristalitos de NiO

DO	Densidad óptica
DRX	Difracción de rayos X
dV/dD	Relación entre derivadas del volumen y diámetro de poro
e⁻	Electrones
EL	Extracto de levadura
EtAL	Etanal
EtDOL	Etanodiol
EUA	Estados Unidos de América
FAG	Flujo de alimentación de solución acuosa de glicerol
FHL	Formiato hidrógeno liasa
FID	Detector de ionización de llama (siglas en inglés)
FTIR	Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (siglas en inglés)
G3P	Gliceraldehido 3-Fosfato
GC	Glicerol crudo
GP	Glicerol puro
GS	Gas de síntesis
H⁺	Protones
LB	Caldo de Lisogenia (del inglés <i>Lysogeny Broth</i>)
mbd	Millones de barriles diarios
MeAL	Metanal
MHAc	Monohidroxiacetona
mta	Millones de toneladas anuales
mtep	Millones de toneladas equivalentes de petróleo
N_yO_x	Óxidos de nitrógeno
OTP	Oxidación a temperatura programada
PEP	Fosfoenolpiruvato
PrENAL	Propenal
R_{GS}	Producción de gas de síntesis
P_{H2}	Producción acumulada de H ₂

POX	Oxidación parcial (siglas en inglés)
PROX	Oxidación preferencial (siglas en inglés)
PV_{H2}	Productividad de H ₂
Q_{gli}	Consumo de glicerol
QLS	Ajuste cuadrático por cuadrados mínimos (siglas en inglés)
RMAG	Relación molar agua:glicerol
RMCAG	Relación molar carrier:agua:glicerol
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta (siglas en inglés)
RTP	Reducción a temperatura programada
S_{BET}	Superficie específica mediante Método BET
S_C	Selectividad a compuestos con carbono
SCW	Reformado en agua supercrítica (siglas en inglés)
S_{H2}	Selectividad a H ₂
SO_x	Óxidos de azufre
SR	Reformado en fase gas (siglas en inglés)
TCD	Detector de conductividad térmica (siglas en inglés)
tn	Toneladas
TT	Tripteína
UE	Unión Europea
VEGH	Velocidad espacial gaseosa horaria
VELH	Velocidad espacial líquida horaria
VEMH	Velocidad espacial másica horaria
V_p	Volumen de poro
WGS	Reacción de intercambio gas-vapor de agua (siglas en inglés)
X₀	Concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial
X_G	Conversión a productos gaseosos
X_L	Conversión a productos líquidos
X_{max}	Densidad celular máxima
X_T	Conversión total
Y_C	Rendimiento a compuestos con carbono

Y_{H_2}	Rendimiento a H_2
$Y_{H_2/G}$	Rendimiento específico de H_2 respecto a sustrato
$Y_{H_2/X}$	Rendimiento específico de H_2 respecto a biomasa
$Y_{X/G}$	Rendimiento específico de biomasa respecto a sustrato

Índice de tablas

TABLA	DESCRIPCIÓN DE CONTENIDOS	PÁGINA
Tabla 2.1	Propiedades físicas y químicas del glicerol (Liley y col., 1997).	18
Tabla 3.1	Masas (g), concentraciones de solución madre, C_{SM} ($g L^{-1}$) y volúmenes de solución madre, V_{SM} (μL) utilizados durante la cuantificación de los compuestos identificados en la fracción líquida de la reacción de reformado en fase gas.	90
Tabla 3.2	Componentes del medio de cultivo LB (<i>Lisogenic Broth</i>).	99
Tabla 3.3	Componentes del medio de cultivo M1 (Hu y Wood, 2010).	103
Tabla 3.4	Componentes del medio de cultivo M2 (Cofré y col, 2012).	103
Tabla 3.5	Componentes del medio de cultivo M3 (Giordano y col., 2010).	104
Tabla 3.6	Protocolo utilizado para la determinación del glicerol en las muestras líquidas.	106
Tabla 4.1	Composición real de metales impregnados en los catalizadores reducidos.	110
Tabla 4.2	Propiedades texturales de los catalizadores reducidos y el soporte $\gamma-Al_2O_3$ calcinado.	112
Tabla 4.3	Diámetro promedio de los cristales de NiO y valor del ángulo del plano (200) de NiO para los catalizadores reducidos.	115
Tabla 4.4	Conversiones (%) y R_{GS} (H_2/CO) obtenidas en reformado en fase gas de glicerol para $4Ni/Al_2O_3$, $4Co-4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ en reacción a 300, 500 y 700 °C.	127
Tabla 4.5	Selectividades a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol para $4Ni/Al_2O_3$, $4Co-4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ en reacción a 300, 500 y 700 °C.	128
Tabla 4.6	Rendimientos a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol para $4Ni/Al_2O_3$, $4Co-4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ en reacción a 300, 500 y 700 °C.	129

Tabla 4.7	Conversiones (%) y P_{GS} en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al ₂ O ₃ , 5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃ , 5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃ y 5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃ en reacción a 500 y 700°C.	140
Tabla 4.8	Selectividades a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al ₂ O ₃ , 5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃ , 5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃ y 5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃ en reacción a 500 y 700°C.	141
Tabla 4.9	Rendimientos a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al ₂ O ₃ , 5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃ , 5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃ y 5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃ en reacción a 500 y 700°C.	141
Tabla 4.10	Conversiones (%) obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol para el catalizador 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes.	150
Tabla 4.11	Selectividades a principales productos (%) obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol para el catalizador 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes.	151
Tabla 4.12	Rendimientos a principales productos (%) obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol para el catalizador 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes.	151
Tabla 4.13	DCC fraccionado empleado para la optimización del medio de cultivo M3. Unidades de las respuestas: ^a mg cels. mL ⁻¹ . ^b adimensional. ^c mmoles.	163
Tabla 4.14	Resultados estadísticos obtenidos luego de aplicar un test de ANOVA a los datos analizados.	164
Tabla 4.15	Criterios seleccionados para realizar el proceso de optimización aplicando la función deseabilidad global.	167
Tabla 4.16	Valores de las respuestas obtenidas mediante la aplicación de RSM aplicando QLS y mediante la verificación experimental.	169

Índice De Figuras

FIGURA	DESCRIPCIÓN DE CONTENIDOS	PÁGINA
Figura 2.1	Perspectivas de crecimiento de la demanda mundial de energía primaria entre 2011 y 2035, en mtep (International Energy Agency, 2013).	8
Figura 2.2	Perspectivas futuras de producción mundial de petróleo, en mbd, considerando el crudo convencional, no convencional y gas natural (International Energy Agency, 2008).	9
Figura 2.3	Estimación de las reservas mundiales de combustibles fósiles (en años), usando el nivel de producción de 2013. Se expone la producción acumulada de carbón, gas natural y petróleo hasta fines de 2012 (círculo menor), las reservas descubiertas para su utilización (círculo intermedio) y los restantes recursos recuperables, es decir la suma entre recursos descubiertos y posibles a descubrir (círculo mayor) (International Energy Agency, 2013).	10
Figura 2.4	Cantidad de energía renovable utilizada respecto de la cantidad de energía consumida a nivel mundial hasta 2010, diferenciando entre los recursos renovables modernos y los tradicionales (REN21, 2012).	12
Figura 2.5	Producción de biodiésel en Argentina (en tn) hasta 2013, diferenciando entre los consumos del mercado interno y exportaciones.	16
Figura 2.6	Principales provincias productoras de biodiésel en Argentina, en función de la cantidad total de biodiésel producida en 2012.	17
Figura 2.7	Reacción general de transesterificación de triglicéridos con alcohol para generar esteres de ácidos grasos (biodiésel) y glicerol (Zhou y col., 2008).	17
Figura 2.8	Principales vías de transformación del glicerol hacia productos de alto valor agregado y/o energético (Len y Luque, 2014).	20

Figura 2.9	Principales procesos utilizados para la producción de H ₂ , agrupados según el tipo de fuente de energía primaria de partida (Pino Priego, 2009).	22
Figura 2.10	Producción y consumo mundial de H ₂ , en mta (Muradov y Veziroglu, 2005).	23
Figura 2.11	Principales vías de transformación de GS (izquierda, hacia combustibles; y derecha, hacia químicos), los cuales corresponden a compuestos de alto valor agregado y/o energético (Talmadge y col., 2013).	26
Figura 2.12	Relaciones de GS más utilizadas en la industria, para la obtención de variedad de compuestos mediante diferentes procesos productivos. La estrella indica la utilización de la reacción de WGS (Infiniti Research Group, 2014).	27
Figura 2.13	Principales bioprocesos desarrollados a escala industrial para obtención de diferentes productos de valor agregado.	52
Figura 2.14	Evolución de la cantidad de trabajos científicos publicados, referidos a procesos biológicos que involucran microorganismos: para la transformación del glicerol (barras azules) y para la conversión del glicerol hacia H ₂ (barras rojas), desde 1996 hasta enero de 2015. (http://www.sciencedirect.com ; palabras clave: "Glycerol", "Microorganism" (barras azules) y "Glycerol", "Microorganism", "Bio-hydrogen" (barras rojas).	53
Figura 2.15	Principales vías metabólicas y expresiones génicas involucradas en la fermentación anaeróbica de glicerol en <i>E. coli</i> MG1655 (Murarka y col., 2008; Gonzalez y col., 2008). Las modificaciones genéticas propuestas son ilustradas por líneas gruesas (sobreexpresión de <i>gldA</i> y <i>dhaKLM</i>) o barras dobles (interrupción de <i>frdA</i> , <i>pta</i> , y <i>fdhF</i>), mientras que las líneas discontinuas ilustran varios pasos (Yazdani y González, 2008).	67

Figura 2.16	Principales vías metabólicas y expresiones génicas involucradas en la síntesis de H ₂ para la cepa de <i>E. coli</i> modificada (C _{HW2}), en relación a la cepa BW25113 frdC (C _{CON}). En rojo aparecen los genes que fueron reprimidos y en verde los genes inducidos (Hu y Wood, 2010).	71
Figura 3.1	Esquema del sistema de análisis utilizado para evaluación catalítica mediante reformado del glicerol en fase gas.	87
Figura 3.2	Esquema del sistema de fermentación utilizado para la caracterización de cepas y el diseño de medios de cultivo.	100
Figura 3.3	Esquema del biorreactor empleado.	101
Figura 4.1	Distribución de tamaños de poro para los catalizadores de Ni y Co reducidos y el soporte γ -Al ₂ O ₃ calcinado	111
Figura 4.2	Distribución de tamaños de poro para los catalizadores de Ni y Ce reducidos y el soporte γ -Al ₂ O ₃ calcinado.	111
Figura 4.3	Perfiles DRX para los catalizadores reducidos y el soporte γ -Al ₂ O ₃ calcinado. \blacklozenge : NiAl ₂ O ₄ y γ -Al ₂ O ₃ ; \bullet : NiO; \blacksquare : Co ₃ O ₄ y NiCo ₂ O ₄ ; \blacktriangle : CoAl ₂ O ₄ .	114
Figura 4.4	Perfiles DRX para los catalizadores reducidos y el soporte γ -Al ₂ O ₃ calcinado. \blacklozenge : NiAl ₂ O ₄ y γ -Al ₂ O ₃ ; \bullet : NiO; \blacksquare : CeO ₂ .	114
Figura 4.5	Perfiles FTIR para los catalizadores reducidos y el soporte γ -Al ₂ O ₃ calcinado.	117
Figura 4.6	Perfiles FTIR para los catalizadores reducidos y el soporte γ -Al ₂ O ₃ calcinado.	117
Figura 4.7a	Perfiles RTP para soporte γ -Al ₂ O ₃ y catalizadores de Ni y Co calcinados.	119
Figura 4.7b	Perfiles RTP para soporte γ -Al ₂ O ₃ y catalizadores de Ni y Ce calcinados.	120
Figura 4.8	Fracción mayoritaria de gases (H ₂ , CO ₂ , CO y CH ₄) obtenida en el reformado en fase gas de glicerol empleando 4Ni/Al ₂ O ₃ a 500°C (a) y 700°C (b) ; 4Co-4Ni/Al ₂ O ₃ a 300°C (c) , 500°C (d) y 700°C (e) ; 12Co-4Ni/Al ₂ O ₃ a 300°C (f) , 500°C (g) y 700°C (h) .	124

- Figura 4.9** Fracción mayoritaria de compuestos en la fracción líquida, obtenida en el reformado en fase gas de glicerol empleando 4Ni/Al₂O₃ a 500°C **(a)** y 700°C **(b)**; 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 300°C **(c)**, 500°C **(d)** y 700°C **(e)**; 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 300°C **(f)**, 500°C **(g)** y 700°C **(h)**. 126
- Figura 4.10.1** Perfiles de OTP obtenidos para los catalizadores 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ al finalizar la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 300°C **(a)**, 500°C **(b)** y 700°C **(c)**, y concentraciones finales de carbón para cada material **(d)**. 130
- Figura 4.10.2** Espectros de FTIR (izquierda) y patrones de DRX (derecha) obtenidos para 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ luego de la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 300°C **(a)** y **(d)**, 500°C **(b)** y **(e)**, y 700°C **(c)** y **(f)**. ♦: NiAl₂O₄ y γ-Al₂O₃; ●: NiO; ■: Co₃O₄ y NiCo₂O₄; ▲: CoAl₂O₄. X: Carbón. 132
- Figura 4.11** Fracción mayoritaria de gases (H₂, CO₂, CO y CH₄) obtenida en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃ a 500°C **(a)** y 700°C **(b)**; 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C **(c)** y 700°C **(d)**; 5Ni-4Ce/Al₂O₃ a 500°C **(e)** y 700°C **(f)**; y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ a 500°C **(g)** y 700°C **(h)**. 135
- Figura 4.12** Fracción mayoritaria de compuestos en la fracción líquida, obtenida en el reformado en fase gas de glicerol empleando 5Ni/Al₂O₃ a 500°C **(a)** y 700°C **(b)**; 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C **(c)** y 700°C **(d)**; 5Ni-4Ce/Al₂O₃ a 500°C **(e)** y 700°C **(f)**; y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ a 500°C **(g)** y 700°C **(h)**. 137
- Figura 4.13.1** Perfiles de OTP obtenidos para los catalizadores 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ al finalizar la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 500°C **(a)** y 700°C **(b)**, y concentraciones finales de carbón para cada material **(c)**. 142

Figura 4.13.2	Espectros FTIR (izquierda) y perfiles DRX (derecha) obtenidos para 5Ni/Al ₂ O ₃ , 5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃ , 5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃ y 5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃ luego de la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 500°C (a) y (c) , y 700°C (b) y (d) . ♦: NiAl ₂ O ₄ y γ-Al ₂ O ₃ ; ●: NiO; ■: CeO ₂ . X: Carbón.	144
Figura 4.14	Fracciones mayoritarias de gases (H ₂ , CO ₂ , CO y CH ₄) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes, alimentando glicerol puro (a) y glicerol crudo (b) .	145
Figura 4.15	Fracciones mayoritarias de gases (H ₂ , CO ₂ , CO y CH ₄) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes, durante el primer ciclo (a) y segundo ciclo de reacción (b) .	146
Figura 4.16	Fracciones mayoritarias de gases (H ₂ , CO ₂ , CO y CH ₄) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes, durante el primer (a) , segundo (b) , tercer (c) y cuarto ciclo de reacción (d) .	148
Figura 4.17	Fracciones mayoritarias de compuestos líquidos, obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes, durante el primer (a) , segundo (b) , tercero (c) y cuarto ciclo de reacción (d) .	149
Figura 4.18	Perfiles OTP a diferentes tiempos de operación en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes (a) y concentraciones finales de carbón (b) .	152
Figura 4.19	Perfiles de consumo de O ₂ en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al ₂ O ₃ en condiciones desactivantes a 24 h (a) y 48 h (b) de operación.	154
Figura 4.20	Evolución de la densidad celular y de la concentración de glicerol, producción de H ₂ y productividad de H ₂ , en función del tiempo de cultivo, para las cepas de <i>E. coli</i> C _{CON} (a) y C _{HW2} (b) utilizando el medio M1. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada.	156

- Figura 4.21** Evolución de la densidad celular y de las concentración de glicerol, producción de H_2 y productividad de H_2 , en función del tiempo de cultivo, para las cepas de *E. coli* C_{CON} **(a)** y C_{HW2} **(b)** utilizando el medio M2. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada. 158
- Figura 4.22** Evolución de la densidad celular y de las concentración de glicerol, producción de H_2 y productividad de H_2 , en función del tiempo de cultivo, para las cepas de *E. coli* C_{CON} **(a)** y C_{HW2} **(b)** utilizando el medio M3. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada. 160
- Figura 4.23** Producción acumulada de H_2 (mmol) en función de la concentración de glicerol ($g L^{-1}$) adicionada al medio de cultivo M3. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada. 161
- Figura 4.24** Superficie de respuesta correspondientes a la respuesta X como función de EL ($g L^{-1}$) y TT ($g L^{-1}$), con NaCl y glicerol en $0,5 g L^{-1}$. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas. 165
- Figura 4.25** Superficie de respuesta correspondientes a la respuesta C_G como función de EL ($g L^{-1}$) y TT ($g L^{-1}$), con NaCl y glicerol en $0,5 g L^{-1}$. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas. 166
- Figura 4.26** Superficie de respuesta correspondientes a la respuesta P_{H_2} como función de EL ($g L^{-1}$) y TT ($g L^{-1}$), con NaCl y glicerol en $0,5 g L^{-1}$. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas. 166

- Figura 4.27** Superficie de respuesta correspondientes a la función de deseabilidad global como función de EL (g L^{-1}) y TT (g L^{-1}), fijando NaCl en $0,54 \text{ g L}^{-1}$ y glicerol en $0,50 \text{ g L}^{-1}$. El máximo corresponde a 0,887, en la región de color naranja. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas. 168
- Figura 4.28** Evolución de la densidad celular y de la concentración de glicerol, producción de H_2 acumulada y productividad de H_2 **(a)**, y de la densidad celular junto con los diferentes parámetros monitoreados durante el cultivo **(b)** en función del tiempo de ensayo, para un cultivo de *E. coli* $C_{\text{HW}2}$, en un biorreactor tipo tanque agitado y empleando el medio optimizado M4. Las flechas rojas indican alimentación de glicerol estéril y las flechas verdes de glicerol y TT estéril. 170
-

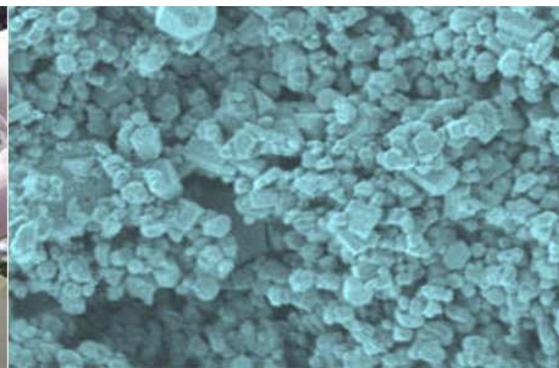
RESUMEN

La dependencia de la humanidad por los combustibles fósiles genera grandes problemas hacia el medioambiente. Las reservas mundiales de combustibles fósiles son limitadas, y desde hace algunas décadas las tecnologías que aprovechan las fuentes alternativas de energía, como la biomasa, aumentaron de manera notable. La producción actual de biocombustibles líquidos se encuentra en aumento, destacándose la producción de biodiesel que genera importantes volúmenes de glicerol. Este compuesto posee bajo precio en el mercado, convirtiéndolo en una materia prima altamente valorizable. La Provincia de Santa Fe cuenta con las principales productoras de biodiesel del país, y existe una importante cantidad de glicerol con potencial de utilización. La industria del hidrógeno (H_2) también está experimentando un constante incremento, y su actual producción se realiza a partir de combustibles fósiles. Resulta por tanto interesante la utilización de glicerol para obtener H_2 . Entre las diferentes tecnologías, el uso de un sistema de reacción empleando catalizadores químicos y realizando reformado en fase gas es factible, debido a su sencilla operabilidad e importante eficiencia de reacción, analizando los procesos que producen la disminución de la actividad catalítica. Respecto a los sistemas biológicos, el empleo de medios de cultivo con microorganismos, los cuales realizan la fermentación del sustrato agregado, brinda facilidades respecto a los pocos recursos necesarios para su desarrollo y por presentar consumos energéticos considerablemente bajos, sin embargo se debe realizar la búsqueda de las formulaciones de medio mas óptimas para alcanzar mayores rendimientos a productos de interés. Durante el reformado en fase gas del glicerol se generó H_2 como producto principal. El aumento de la carga de precursor en los catalizadores favoreció la conversión a productos gaseosos a menores temperaturas, y facilitó la eliminación parcial del depósito carbonoso formado durante la reacción. En la fermentación del glicerol, la cepa identificada como promisoría para la producción de H_2 desde glicerol presentó mayor consumo de glicerol y producción acumulada de H_2 que la cepa control, y la optimización de la formulación de un medio de cultivo demostró que el crecimiento celular puede ser mejorado, incrementando el consumo del sustrato y aumentando la producción del compuesto de interés. Ambos procesos permitieron utilizar una materia prima renovable, valorizando la creciente industria de producción del biodiesel y e incrementando el valor de los subproductos generados.

ABSTRACT

The dependence of humanity by the fossil fuels generates important consequences for the environment. World reserves of fossil fuels are limited, and for some decades the technologies that use alternative energy sources such as biomass are increased significantly. Current production of liquid biofuels is increasing, and the biodiesel production especially generates large quantities of glycerol. This compound has a low market price, making it a highly recoverable raw material. Santa Fe Province has the main biodiesel production plants of all the country, and exist a significant amount of glycerol in excess. The hydrogen industry (H_2) is also having a steady increase, and its current production come from fossil fuels. It is therefore interesting the glycerol utilization for H_2 production. Among the different technologies, is feasible to employ a chemical reaction system employing catalysts and performing the steam reforming, because the system is easily to operate and has significant reaction efficiency, analyzing during this process the decrease in catalytic activity. With respect to biological systems, the use of culture media with microorganisms, which perform the substrate added by fermentation, provides facilities because of only few resources are needed for its development and present considerably low energy consumption levels. However, should be searched the more optimal formulations to achieve higher yields for desirable products. During the glycerol steam reforming, H_2 was generated as the main product. The increment in the promoter loading on the analyzed catalyst favored the conversion to gaseous products at lower temperatures, and provided the partial removal of carbonaceous deposit formed during the reaction. During the glycerol fermentation process, the strain identified as promising for H_2 production showed higher glycerol consumption and cumulative H_2 production that the control strain, and optimization of the culture medium formulation showed that cell growth can be improved, increasing both substrate consumption and production of the interest compound. Catalytic and biological processes allowed using a renewable raw material, with an important interest for the biodiesel industry and increasing the value of the generated products.

Capítulo 1



Presentación

1.1 Justificación

La gran dependencia de la humanidad hacia la utilización de combustibles fósiles para generar energía y productos de consumo, está generando problemas cada vez más evidentes hacia el medioambiente, debido a que su combustión produce considerables cantidades de compuestos contaminantes como dióxido de carbono (CO_2), compuestos orgánicos volátiles (COV) y óxidos de nitrógeno (N_yO_x) y azufre (SO_x), que son eliminados al medio circundante. Estos componentes generan problemas de acidificación, contaminación del aire y del agua, daño de las capas terrestres y modificación de la capa de ozono, lo que contribuye al debilitamiento del medio ambiente y al incremento en la temperatura global debido al efecto invernadero (McKinney y Schoch, 2012).

Las reservas mundiales de combustibles fósiles son limitadas, y su agotamiento fue estimado para los próximos 60 años, siempre que se mantengan los actuales niveles de consumo. Los países de Medio Oriente concentran más de la mitad de las reservas mundiales de petróleo crudo, mientras que los restantes países presentan yacimientos que ya se encuentran en fase descendente de producción, y apuestan a tecnologías de extracción de petróleo no convencionales que son más costosas y altamente contaminantes. La desaceleración en el crecimiento de las reservas mundiales de petróleo, junto con los largos períodos necesarios para la concreción de proyectos e inversiones en exploración y desarrollo, generan incertidumbres en el mercado global referidas a la inestabilidad en el precio del crudo, la imposibilidad de mantener un continuo suministro, y la dificultad en lograr un mejoramiento de la calidad del medio ambiente (Owen y col., 2010).

Desde hace más de dos décadas, las tecnologías de aprovechamiento de fuentes de energía alternativas se incrementaron notablemente, impulsado por la alta volatilidad de los precios de los combustibles fósiles, el creciente consumo de energía en los países importadores de energía, las preocupaciones hacia el medio ambiente y el cambio climático, y la disminución en el precio de las tecnologías renovables como resultado de un mayor desarrollo tecnológico (REN21, 2012). Gracias a todo ello, la utilización de la biomasa como recurso energético limpio y renovable ha aumentado en gran medida, permitiendo la obtención de energía y diversos productos con alto valor agregado y/o energético de una manera más responsable con el medio ambiente. Países de Europa y Norteamérica han sido pioneros en el desarrollo de estas tecnologías, apoyado por proyectos y programas

gubernamentales que estimulan la producción de energías renovables no contaminantes (REN21, 2012).

En los últimos años, la producción de biocombustibles líquidos a nivel global se incrementó notablemente, gracias a la aplicación de numerosas políticas y control de precios implementados en distintas partes del mundo, para favorecer el crecimiento del mercado de biocombustibles frente al de los combustibles fósiles (International Energy Agency, 2011). El principal subproducto obtenido en la producción de biodiesel es el glicerol, que es un compuesto con importante utilidad y aplicabilidad industrial, y que posee un precio bajo en el mercado debido al incremento significativo en la producción de biodiesel. Esto lo convierte en una materia prima altamente valorizable y lo hace enormemente atractivo para su transformación hacia diferentes compuestos, diversificando aún más las posibles utilidades en la industria (Len y Luque, 2014). En Argentina, el mayor centro de producción de biodiesel se encuentra en la región del Gran Rosario, por lo que el potencial para el desarrollo de diferentes tecnologías para la transformación del glicerol hacia productos de mayor valor agregado y/o energético es altamente factible, contribuyendo al mismo tiempo al mejoramiento medioambiental por considerarse un compuesto que proviene de biomasa, siendo menos contaminante que aquellos generados desde combustibles fósiles (van Bennekom y col., 2012a).

Otra industria de gran importancia a nivel mundial es la del hidrógeno (H_2), compuesto que es principalmente producido a partir de materias primas no renovables, y que es ampliamente utilizado en la industria, así como para la generación de energía y como combustible en el transporte. Los avances relacionados a investigación, desarrollo y producción de celdas de combustible son cada vez más importantes, pudiendo ser utilizadas en la generación de energía en aplicaciones móviles y estacionarias. En estos dispositivos, la energía química se transforma en eléctrica, y el combustible y oxidante no reaccionan en un proceso de combustión, por lo que no se producen emisiones de gases de efecto invernadero y se contribuye en gran medida al mejoramiento medioambiental (San Miguel y col., 2006). El gas de síntesis (GS), una mezcla de H_2 y monóxido de carbono (CO), también representa gran interés industrial para la obtención de energía y de numerosos compuestos de alto valor, con un crecimiento sostenido en el mercado global que permitirá colocarlo en una posición de privilegio dentro de las energías renovables en los próximos años (Infiniti Research Group, 2014).

Diversos países han incrementado inversiones en infraestructura, sistemas de almacenamiento y desarrollo de celdas de combustible para impulsar el consumo de H_2 hacia la generación de energía (Botas y col., 2005). En el caso de nuestro país, existe una ley y diferentes resoluciones que buscan incentivar el desarrollo de tecnologías que permitan la utilización del H_2 como combustible. Sin embargo, los avances a gran escala fueron escasos, desaprovechando el potencial de nuestro territorio hacia la generación de H_2 a partir de fuentes renovables, debido a las características inigualables en cuanto a recursos naturales (Rodríguez, 2013).

El desarrollo de numerosas metodologías de generación de H_2 a partir del glicerol ha sido ampliamente investigado. Entre las diferentes tecnologías, el reformado catalítico en fase gas presenta gran interés debido a la mayor facilidad en el manejo de las características operativas del sistema y a la obtención de una eficiencia de reacción superior que para otros procesos catalíticos. El incremento en los estudios sobre el reformado del glicerol en fase gas para la producción de H_2 permitió comprender con más detalle las reacciones involucradas en el mecanismo de reacción, facilitando la selección de condiciones de trabajo que permitan aumentar la producción de H_2 u otros compuestos de interés, minimizando la aparición de reacciones laterales indeseables (Dou y col., 2009).

En el caso de los distintos procesos desarrollados mediante vías biológicas, la fermentación del glicerol empleando microorganismos también ha sido ampliamente descrita en la literatura. Sus principales ventajas residen en la utilización de temperaturas más bajas y menor consumo de energía que las reacciones químicas, (Lin y Chang, 2004); además no se necesita emplear una fuente lumínica externa como en los procesos fotobiológicos, presenta facilidad en el control de las condiciones operativas, y es posible trabajar con una gran variedad de cultivos mixtos o puros. El incremento de las publicaciones relacionadas al estudio de las vías metabólicas implicadas en la fermentación facilitó enormemente la comprensión de diferentes mecanismos celulares y permitió realizar procesos más eficientes y obtener mejores rendimientos de productos de interés. Junto con ello, el desarrollo de una serie de técnicas que utilizan las matemáticas, estadística y lógica formal, forman en conjunto una herramienta muy eficaz y aplicable para la determinación de las condiciones operativas óptimas del sistema de trabajo bajo estudio, ahorrando en gran medida tiempo y recursos (Tabandeh y col., 2008).

Por lo tanto, representa un gran interés el estudio de la transformación del glicerol como subproducto económico, renovable y abundante, proveniente de la

creciente industria de producción de biodiesel, hacia compuestos con valor agregado y/o energético, como H_2 y GS, los cuales son de gran utilidad en diferentes ramas de la industria y en la producción de energía. Los ensayos realizados, cuyos resultados se presentan, abarcan investigaciones tanto en procesos catalíticos como en sistemas biológicos: el primero se fundamenta en la obtención de un material con adecuada actividad catalítica y estabilidad durante el reformado en fase gas del glicerol, mientras que la parte biológica se centra en la utilización de un organismo vivo modificado genéticamente, capaz de realizar la transformación del compuesto de partida mediante fermentación en condiciones estrictamente anaeróbicas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

► Contribuir al desarrollo de conocimientos en relación a la producción de hidrógeno a través de procesos químicos y biológicos, de forma de valorizar el glicerol como subproducto de la obtención del biodiesel y promover un desarrollo ambiental sostenible utilizando materias primas renovables.

1.2.2 Objetivos específicos

► Preparar y caracterizar catalizadores de níquel-cobalto y níquel-cerio soportados en alúmina, aptos para la reacción de reformado en fase gas del glicerol para la producción de hidrógeno.

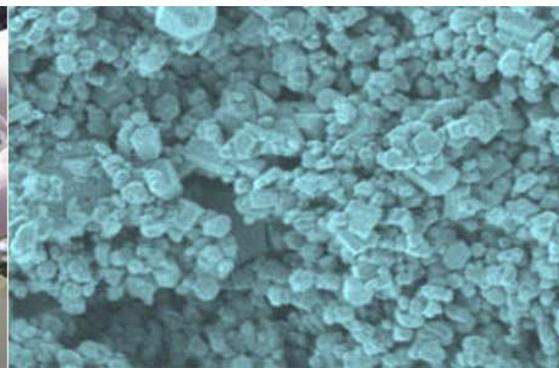
► Evaluar el comportamiento de todos los catalizadores preparados, optimizando condiciones de operación, caracterizando los procesos de desactivación y determinando condiciones de regeneración.

► Desarrollar y optimizar medios de cultivo suplementados con glicerol para la producción fermentativa de hidrógeno por cepas de *Escherichia coli*.

► Evaluar las formulaciones optimizadas en sistemas escalables.

► Divulgar al medio científico y productivo los conocimientos alcanzados.

Capítulo 2



Introducción

2.1 Combustibles fósiles

Desde comienzos del presente siglo se ha reforzado el cuestionamiento del modelo energético vigente, basado preferentemente en la explotación y utilización de los combustibles fósiles, como el petróleo, carbón mineral y gas natural, los cuales fueron formados de manera natural a lo largo de millones de años. La situación energética mundial actual es el resultado de la combinación de diversas tendencias económicas, políticas, tecnológicas, sociales y ambientales, entre otras, que confluyen en un complejo panorama de crisis y ajustes, signado en los años más recientes por escalada y fluctuaciones de precios, sobre todo en hidrocarburos y especialmente en el petróleo. Los límites de éste modelo resultan cada vez más evidentes, tanto en el orden económico (incertidumbre en mantener un suministro continuo y elevados precios de la energía), así como en el plano social (inequidad y pobreza energética) y medioambiental (implicaciones adversas para el entorno y dificultad para garantizar un cuidado responsable hacia el medio ambiente).

Como parte de las irracionales tendencias energéticas, el consumo global de energía primaria aumentó unas diez veces a lo largo del siglo XX, mientras que la población mundial creció unas cuatro veces (Runnalls y Mackay, 2005), indicando que el dinamismo de la demanda energética continuará en constante aumento en las próximas décadas. Según las últimas estadísticas disponibles, los combustibles fósiles representan alrededor del 80% del consumo global de energía primaria, distribuidos de la siguiente forma: petróleo 31%; gas natural 21%, y carbón 29%. El consumo restante está repartido entre las fuentes renovables (14%) y la energía nuclear (5%), sobre una demanda energética total de 13070 millones de toneladas equivalentes de petróleo (mtep). Las fuentes renovables (recursos que pueden ser restaurados por procesos naturales a velocidades superiores a las de su consumo) se dividen entre las fuentes tradicionales de biomasa (10%), hidroeléctrica (2%) y las llamadas nuevas fuentes renovables, con 2% (**Figura 2.1**). Sin embargo, no fueron predichos grandes cambios respecto al consumo en los próximos 25 años. Tanto petróleo como carbón, disminuirán 4% respecto a la matriz energética observada en 2011, mientras que gas natural aumentará a 24%, con una demanda energética total estimada en 17386 mtep (International Energy Agency, 2013).

El mayor consumo de petróleo a nivel mundial, según datos de 2012, ocurrió en el sector transporte (63,7%), seguido por sectores de usos no energéticos del petróleo como la petroquímica (16,0%), luego agricultura, servicios públicos y

comerciales, y residencial (11,8%), y finalmente la industria que utiliza al petróleo como energía (8,5%) (International Energy Agency, 2014). En petroquímica, se emplea aproximadamente 10% como materia prima y el 6% restante como combustible, lo que indica que dicha industria emplea una materia prima no renovable, cuyo uso no controla. Considerando el consumo de gas natural en 2012, el orden por sectores fue agricultura, servicios públicos y comerciales, y residencial (43,4%), industria (36,5%), usos no energéticos del petróleo (13,5%) y transporte (6,6%) (International Energy Agency, 2014).

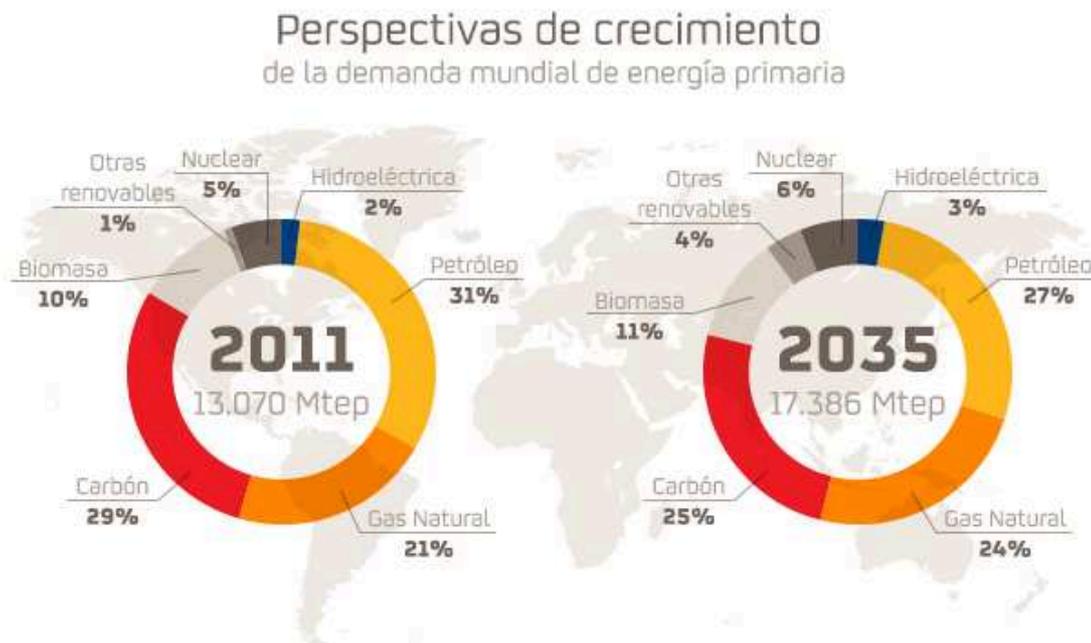


Figura 2.1: Perspectivas de crecimiento de la demanda mundial de energía primaria entre 2011 y 2035, en mtep (International Energy Agency, 2013).

Ha sido demostrado que la producción mundial de petróleo alcanzará un punto máximo de producción en cuestión de pocos años (“pico de petróleo”), comenzando luego un sostenido descenso, lo que favorecerá el incremento gradual del precio del crudo. Estudios realizados por diferentes entidades predicen que la producción de petróleo podrá crecer de su nivel actual de 83 millones de barriles diarios (mbd) a 105 mbd para el 2030, siempre contemplando los aportes del crudo convencional, no convencional y gas natural (**Figura 2.2**) (International Energy Agency, 2008). En años anteriores, se predijo que los suministros de petróleo podrían llegar hasta 120 mbd para 2030, sin embargo estos valores fueron disminuyendo gradualmente con el correr de los años. Varios investigadores consideran que el suministro de petróleo sería casi imposible incluso manteniendo valores entre 90 a 95 mbd, y sostienen que el mundo ya ha superado el punto máximo en la producción de

petróleo (Owen y col., 2010). Otros estudios describen el desarrollo de una nueva versión del modelo de Hubbert, que tuvo en cuenta las tendencias individuales que ocurren en cada región o país productor y consumidor, para proporcionar una visión más realista y precisa. De esta forma, se estimó que la producción mundial llegará al pico máximo entre los años 2020 y 2025, y que las reservas mundiales de petróleo se están agotando a un ritmo anual de 2,1% (Nashawi y col., 2010).

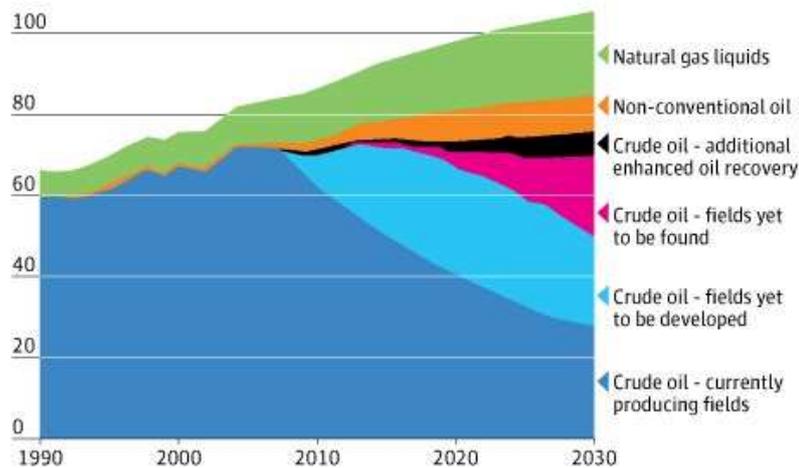


Figura 2.2: Perspectivas futuras de la producción mundial de petróleo, en mbd, considerando el crudo convencional, no convencional y gas natural (International Energy Agency, 2008).

En cuanto a las perspectivas del mercado petrolero, resulta preocupante la desaceleración en el crecimiento de las reservas de petróleo en los últimos 20 años, junto con la constante incertidumbre del precio y los largos períodos de maduración de las inversiones en exploración y desarrollo. Muchos yacimientos ubicados en países y regiones fuera de Medio Oriente (como Rusia, el Mar del Norte, Alaska y África Occidental), que satisfacen principalmente las economías de EUA., Europa y China, ya han alcanzado su pico productivo y otros lo alcanzarán en los próximos años, lo que se traduce en un reforzamiento de la dependencia de Medio Oriente, donde se concentra más de 60% de las reservas mundiales de petróleo. Existen más de 70.000 yacimientos petrolíferos conocidos en el mundo, aunque sólo 500 son de grandes proporciones, y representan el 60% de la producción de petróleo convencional (Höök y col., 2009). De ellos, 430 están en plena producción, aunque 260 ya están en declive. De los 500, existen 26 en Medio Oriente, los cuales se hallan en fase ascendente de producción, a diferencia de los presentes en regiones de EUA y Rusia, los cuales están estables o en fase descendente de producción (International Energy Agency, 2013). Considerando las

reservas de petróleo, la producción actual y el consumo a nivel mundial, la vida útil estimada de las reservas ubicadas en Oriente Medio sería de 79 años, las de Latinoamérica de 49 años y las de Norteamérica de sólo 15 años, con lo que las reservas existentes se agotarán en unos 54 años (**Figura 2.3**) (British Petroleum, 2014). Considerando el gas natural, se estima que la vida útil de las reservas en Medio Oriente sería de 200 años, las de Latinoamérica de 44 años y las de Norteamérica de 13 años, por lo que según su consumo mundial, las reservas se agotarían en alrededor de 61 años (British Petroleum, 2014). Para el carbón, más de la mitad de las reservas están ubicadas en tres países: EUA, Rusia y China, estimando que según el consumo actual las reservas se agotarían en 142 años.

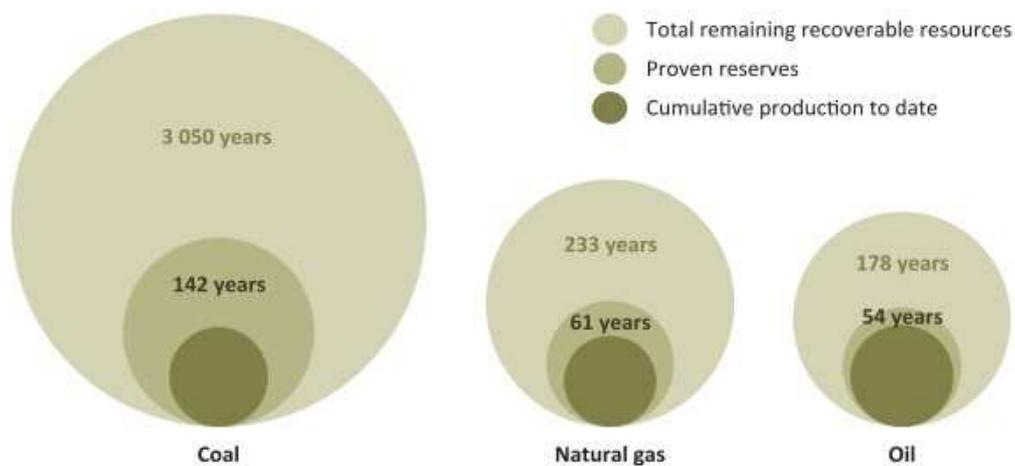


Figura 2.3: Estimación de las reservas mundiales de combustibles fósiles (en años), usando el nivel de producción de 2013. Se expone la producción acumulada de carbón, gas natural y petróleo hasta fines de 2012 (círculo menor), las reservas descubiertas para su utilización (círculo intermedio) y los restantes recursos recuperables, es decir la suma entre recursos descubiertos y posibles a descubrir (círculo mayor) (International Energy Agency, 2013).

De los combustibles fósiles, el gas natural es el menos contaminante en cuanto a emisiones de carbono, mientras que el carbón mineral y el petróleo generan casi el doble de emisiones de carbono respecto al gas natural. La combustión de los combustibles fósiles produce importantes cantidades de compuestos contaminantes que normalmente están presentes de forma natural en la estructura de los mismos, tales como CO_2 , COV, N_yO_x y SO_x (McKinney y Schoch, 2012). Estos componentes generan problemas tales como acidificación, contaminación del aire y del agua, daño de las capas superficiales terrestres y modificación del ozono troposférico, contribuyendo al debilitamiento del medio ambiente y aumentando el efecto

invernadero (McKinney y Schoch, 2012). Los países desarrollados consumen 61% del petróleo y emiten 63% del CO₂; mientras que en los países subdesarrollados las proporciones correspondientes son 39 y 37%, respectivamente (Watkins, 2005). En los últimos años, el debate acerca de las implicaciones económicas adversas de los altos precios petroleros para los países importadores de energía se ha combinado con una nueva ola de preocupaciones acerca de los efectos ecológicos negativos si se mantienen los actuales patrones de producción y consumo de energía, donde predominan los combustibles fósiles.

2.2 Energías alternativas y biomasa

Desde hace más de dos décadas, las tecnologías de aprovechamiento de fuentes de energía alternativas (fuentes de energía distintas a las tradicionales) aumentaron de manera importante, intensificándose la producción de energía a partir de estas fuentes. En 2010, la energía renovable suministró alrededor de 16,7% del consumo mundial de energía, con un 8,2% generado desde energía renovable moderna (hidroeléctrica, eólica, solar, geotérmica, biocombustibles y biomasa), mientras que un 8,5% provino de la considerada biomasa tradicional, la cual es renovable y es utilizada para hogares y calefacción en diferentes zonas de países en desarrollo (**Figura 2.4**) (REN21, 2012). Las energías renovables han experimentado un rápido crecimiento a nivel mundial desde 1990, a una tasa promedio anual de 2,9% hasta 2010. El proceso de transición hacia una mayor participación de las energías renovables en el mundo ha sido impulsado por una serie de factores, entre los cuales se destacan las preocupaciones en el continuo abastecimiento de energía en países importadores, la alta volatilidad de los precios de los combustibles fósiles, las preocupaciones por las crecientes emisiones de gases que generan el efecto invernadero y por ende el cambio climático, y la caída en el precio de las tecnologías renovables como resultado de un mayor desarrollo tecnológico (REN21, 2012).

En la actualidad, la creciente utilización de la biomasa como recurso energético limpio y renovable, permite la obtención de energía y diversos bioproductos con alto valor agregado y/o energético. La biomasa engloba un amplio conjunto de compuestos orgánicos, que pueden clasificarse en naturales, residuales y cultivos energéticos. La biomasa natural se produce sin intervención humana (ramas o árboles caídos), mientras que la residual es subproducto o descarte generado de

las actividades agrícolas, silvícolas y ganaderas (rastrajos, podas, excrementos), la industria agroalimentaria (bagazos, cáscaras, vinazas) y maderera (papeleras, aserraderos, mueblerías), y los residuos de depuradoras (lodos, aguas) y del reciclado de aceites; por su parte los cultivos energéticos son aquellos destinados a la producción de biocombustibles (oleaginosas, cereales, colza, palma, remolacha, caña de azúcar, lignocelulósicos) (Elías Castells y Jurado de Gracia, 2005). Sus principales aplicaciones son en la generación de energía térmica y/o eléctrica, o su empleo directo en producción de calor. Sin embargo, la forma más eficiente de utilizar la biomasa es mediante la co-generación, proceso que utiliza electricidad (producto primario) y calor (producto secundario), y que años atrás no era aprovechado en las centrales eléctricas, donde el calor escapaba y contaminaba térmicamente la atmósfera (Valle Pereña y Ortega Navarro, 2012).

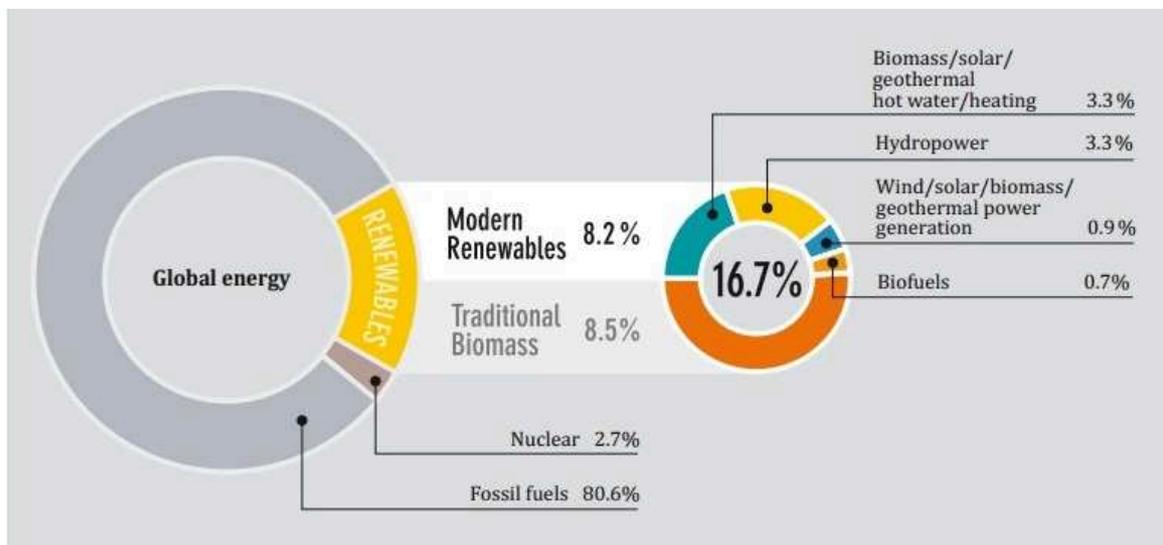


Figura 2.4: Cantidad de energía renovable utilizada respecto de la cantidad de energía consumida a nivel mundial hasta 2010, diferenciando entre los recursos renovables modernos y los tradicionales (REN21, 2012).

La demanda de biomasa creció a una tasa promedio anual de 1,4% entre el 2002 y 2009, mientras que la producción de electricidad a partir de biomasa se incrementó a una tasa promedio anual de 7,0% durante el período entre 2000 y 2010 (Chum y col., 2011). De la demanda global de biomasa con fines energéticos, alrededor del 86% se utiliza para calefacción y/o refrigeración, en cocinas y aplicaciones industriales. Del 14% restante, 10,5% se utiliza para la generación de electricidad, calor y energía, mientras que el otro 3,5% es empleado para la producción de biocombustibles líquidos para transporte (Chum y col., 2011). Hasta el año 2011, los países o regiones líderes en términos de generación de energía a

partir de biomasa sólida fueron la UE con un 36% de la producción mundial, dividida mayoritariamente entre Alemania, Suecia, Finlandia, Reino Unido y Países Bajos, los que representan dos tercios de la producción de electricidad en esta región (principalmente a partir de plantas de co-generación y de electricidad); luego EUA con alrededor de 19% (principalmente desde plantas de co-generación y residuos sólidos urbanos); Brasil con 12,5% (basado en la utilización de bagazo para co-generación); China con 6% (donde la primera central de biomasa comenzó a funcionar en 2006), India con 5,3% y Japón con 4,6% (REN 21, 2012). En Argentina, el aprovechamiento de biomasa con fines energéticos ha crecido sostenidamente en los últimos años. El uso de residuos del procesamiento forestal y caña de azúcar, así como desperdicios de otros cultivos (cáscaras, tallos, hojas) permiten la generación de vapor y energía a gran escala (Hilbert, 2013).

En la última década, las mejoras en la logística de recolección de la biomasa, el transporte y posterior almacenamiento, así como el notable crecimiento del comercio internacional de materias primas referidas a biomasa, han definitivamente incorporado el concepto de “biorrefinería”, la instalación productiva que integra equipamiento y procesos para la transformación de biomasa en combustibles, energía, calor y bioproductos con valor agregado, siendo análogo a la definición de refinería, la unidad industrial básica relacionada con el procesamiento del petróleo crudo para la producción de múltiples combustibles y productos (Smith, 2007). La obtención de compuestos con alto valor agregado y/o valor energético a partir de una biorrefinería, sumado a la ausencia de restricciones en cuanto al tamaño de las instalaciones productivas, permitió mejorar notablemente la rentabilidad y competitividad de los bioproductos frente a otros compuestos de origen no renovable, permitiendo la reinversión en nuevas biorrefinerías (REN 21, 2012).

2.3 Biocombustibles y biodiésel

Una biorrefinería típica es capaz de generar principalmente tres tipos diferentes de productos: biocombustibles (biodiésel y bioetanol), bioenergía (calor y electricidad) y bioproductos derivados (por ejemplo, ácido succínico y ácido poliláctico) (King, 2011). Los biocombustibles pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, y su finalidad es producir energía mediante reacción de combustión. Existen varios tipos de biocombustibles, que se clasifican de acuerdo a la materia prima utilizada y a la tecnología empleada. Los biocombustibles de primera

generación son producidos a partir de las porciones alimenticias de las plantas provenientes de cultivos agrícolas, aprovechando su alto contenido de almidón, azúcares y aceites. El bioetanol se puede obtener del maíz, caña de azúcar o remolacha; el biodiésel a partir del aceite de soja, girasol, colza, palma, coco o maní; también se consideran de primera generación los obtenidos a partir de grasas animales, y grasas y aceites vegetales de desecho (provenientes de la cocción). Los biocombustibles de segunda generación son producidos a partir de residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Los procesos de producción tienen un nivel de complejidad más alto, e involucran la sacarificación, fermentación, Fischer-Tropsch, procesos de gas a líquidos (GTL) y biomasa a líquidos (BTL), pudiendo obtenerse etanol, metanol, GS, biodiésel, 2,5-dimetilfurano, entre otros. Los materiales de partida pueden ser bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz (tallo, hojas y marlo), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles. Los biocombustibles de tercera generación son aquellos producidos a partir de insumos vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con alta densidad energética almacenada en sus componentes (cultivos energéticos). Entre ellos están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde-azules. Algunos procesos para obtener estos biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo, sin embargo existen avances relacionados a la producción de biodiésel y etanol a gran escala. Los biocombustibles de cuarta generación, engloba a todos aquellos producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean CO₂ o alguna otra fuente sencilla de carbono para la obtención de biocombustibles. A diferencia de las restantes, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de biocombustible. La generación de biocombustibles por esta vía se encuentra en fase teórica y a escala laboratorio (Álvarez Maciel, 2009).

En los últimos cinco años, la producción de biocombustibles líquidos a nivel global aumentó a una tasa promedio anual del 17% para el bioetanol y 27% para el biodiésel (Licht, 2012a; Licht, 2012b). Los biocombustibles han hecho una creciente contribución como combustibles para transporte, proporcionando actualmente energía para el 3% del transporte a nivel mundial (International Energy Agency, 2011). Esto fue logrado gracias a las numerosas políticas y control de precios implementados en distintas partes del mundo, para favorecer el crecimiento del mercado de biocombustibles frente al de los combustibles fósiles. Sin embargo, aunque el biodiésel y bioetanol son preferentemente utilizados en el sector del

transporte, también son empleados para la generación de electricidad y co-generación de energía. Existen numerosas plantas de co-generación de energía completamente operativas con biocombustibles líquidos en EUA, Alemania, Italia y Reino Unido, así como centrales eléctricas alimentadas por bioetanol y biodiésel en Brasil y Argentina, respectivamente (REN 21, 2012).

El biodiésel, una mezcla de ésteres de ácidos grasos, es obtenido a escala industrial mediante transesterificación de aceites vegetales con metanol, o en ciertos casos con etanol u otros alcoholes (Vicente y col., 2004). Las principales fuentes de aceite vegetal suelen ser los cultivos de soja, colza y otras oleaginosas, así como otras variedades con mayor rendimiento por hectárea, tales como palma aceitera, jatropha, ricino, entre otras. La UE estableció el agregado de 2% de biodiésel en combustibles fósiles (luego denominado B2) para transporte para fines de 2005, aumentándolo a 6% (B6) para fines de 2010 y 10% (B10) para el 2020 (EU Parliament, 2009). En EUA, fue decretado en 2007 la modificación del estándar de combustibles renovables, llevando el volumen de combustible renovable a mezclar con el combustible fósil desde 34 mil millones de litros en 2008 hasta 136 mil millones de litros para 2022 (US EPA, 2007). En Canadá, el gobierno nacional impuso la incorporación de 2% (B2) de biodiésel en el diesel comercial para 2009, sin embargo algunas provincias siguieron reglamentaciones particulares, con valores entre B2 a B5 para 2010. China se propone llegar a un 10% de biodiésel para 2020. En Colombia, la Ley 939 de 2004 estableció la incorporación de 5% de biodiésel de palma (B5) en el diesel fósil, con la idea de favorecer la producción de biocombustibles en el país. La aprobación de la Ley Federal 11.907 del 2005 en Brasil, estableció 2% de biodiésel a mezclar al diesel (B2) a partir de 2008, llevándola a 5% (B5) en 2013 y 10% (B10) para 2014, con la propuesta de alcanzar el B20 para el año 2020. En Argentina, la Ley 26.093 de 2006 determinó incorporar 5% de biodiésel al gasoil (B5) comercializado dentro del territorio nacional hasta 2010 (Cámara de Diputados y Senadores, 2006a), siendo luego incrementado al 7% (B7) según Resolución 554/2010 (Secretaría de Energía, 2010).

Según datos del 2013, los principales países productores de biodiésel fueron EUA (4,5 millones de toneladas anuales, mta), Alemania (2,7 mta) Indonesia (2,6 mta), Brasil (2,5 mta) y Argentina (2,0 mta), que disminuyó su producción en 20% respecto de 2012 (Mielke, 2014). Esta disminución en la producción de biodiésel, que no fue observada años anteriores (**Figura 2.5**), ocurrió principalmente debido a los altos derechos de exportación y al régimen impositivo no conveniente

establecido por el Gobierno Nacional, junto con las medidas antidumping aplicadas por la UE y la posterior acción del gobierno español de excluir a las fábricas argentinas de biodiésel para exportar a dicho país entre 2013 y 2014. Ante ello, el Gobierno Nacional redujo la alícuota del derecho de exportación a mediados del 2014 y a la vez eximió de impuestos a todo el biodiésel generado. Este nuevo esquema permitió explorar nuevos mercados de exportación no contemplados con anterioridad, como Australia, Corea del Sur y Taiwán. Además, se definió mediante Resolución 1125/2013, que las mezclas de biodiésel con combustibles fósiles se elevarán al 10% (B10) para incorporar el exceso de producción al mercado local y mantenerlo competitivo, y dispuso que las usinas térmicas comiencen a utilizar B10 en su mezcla de combustibles para generación de calor y electricidad (Secretaría de Energía, 2013). Antes que el Gobierno apruebe estas resoluciones, se estimó una disminución en la producción de biodiésel para 2014 de 2,0 mta a 1,8 mta, sin embargo con la aplicación de las medidas se produjo una mejora en el nivel de producción, estimando un volumen no inferior a 2,4 mta.



Figura 2.5: Producción de biodiésel en Argentina (en tn) hasta 2013, diferenciando entre los consumos del mercado interno y exportaciones.

A nivel nacional, el 77% de la producción se encuentra concentrada en la provincia de Santa Fe (**Figura 2.6**), en la zona denominada Gran Rosario (ciudades de Rosario, San Lorenzo y Puerto General San Martín). Esta zona es un punto estratégico entre la recepción de la materia cruda (poroto de soja), la instalación de las principales plantas aceiteras para la producción de los aceites vegetales para consumo (y materia prima para el biodiésel) y un importante puerto fluvial con terminales de carga distribuidas a lo largo de toda esta zona sobre el Río Paraná, para el transporte de grandes volúmenes de producto en buques tanque. La

capacidad instalada se encuentra en el orden de los 3,2 mta, y se prevén obras que añadirán mayor capacidad. Sin embargo, las grandes plantas productoras no operan a máxima capacidad dadas las limitaciones en los volúmenes de exportaciones y a la falta de mercados a los cuales exportar.

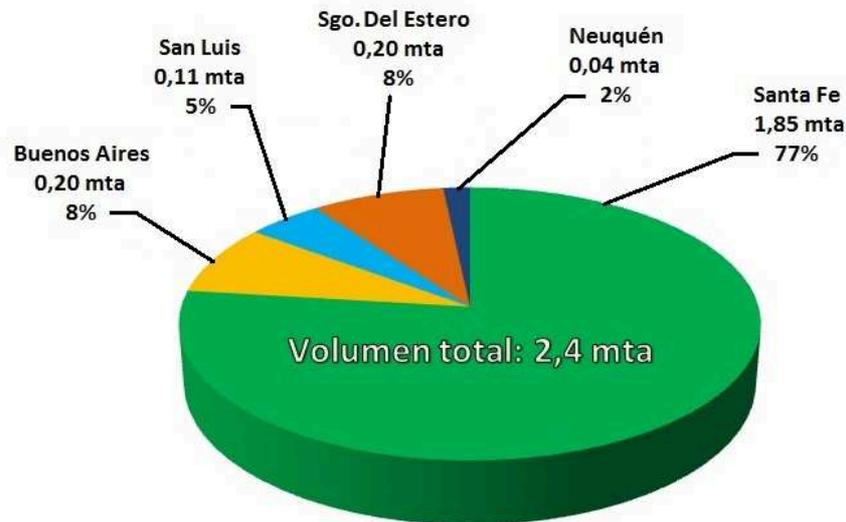


Figura 2.6: Principales provincias productoras de biodiésel en Argentina, en función de la cantidad total de biodiésel producida en 2012.

2.4 Glicerol

Durante el proceso de producción de biodiésel, luego de realizada la reacción de transesterificación de aceites vegetales con alcohol (como metanol), se obtiene una mezcla de esteres de ácidos grasos (biodiésel) junto con un subproducto que representa alrededor del 10% p/p del producto total: el glicerol (**Figura 2.7**) (Zhou y col., 2008). Conocido también como glicerina, es un compuesto químico que tiene tres grupos hidroxilo alcohólicos del tipo hidrofílicos, con características físicas y químicas detalladas en la **Tabla 1**, y que puede ser separado del biodiésel (Liley y col., 1997).

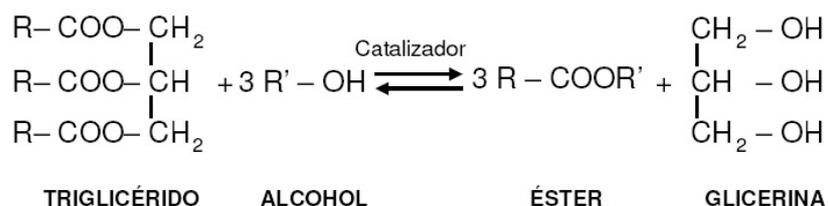


Figura 2.7: Reacción general de transesterificación de triglicéridos con alcohol para generar esteres de ácidos grasos (biodiésel) y glicerol (Zhou y col., 2008).

Tabla 2.1: Propiedades físicas y químicas del glicerol (Liley y col., 1997).

Propiedades	Valores
Fórmula química	$C_3H_8O_3$
Masa molar	92,09 g mol ⁻¹
Estado y apariencia	Líquido e incoloro
Densidad	1,260 g mL ⁻¹
Punto de fusión	17,9 °C
Punto de ebullición	290 °C
Solubilidad en 100 partes de	
Agua	Infinita
Alcohol	Infinita
Eter	Insoluble
Calor de fusión a 18 °C	47,49 cal g ⁻¹
Viscosidad	
A 100% pureza	10 cP = 0,010 Pa s
A 50% pureza	25 cP = 0,025 Pa s

El glicerol tiene más de 1500 posibles usos industriales: como ingrediente en diversas formulaciones farmacéuticas (excipiente, antiséptico, inhibidor de cambios enzimáticos, disolvente de compuestos, humectante), en fabricación de productos de cuidado personal y oral (jabones, cremas de piel y dentales, enjuagues bucales), en productos alimenticios (aditivo empleado de forma directa o derivado, tal como el mono-estearato de glicerol), en la producción de tabaco (plastificante, regulador de humedad), en elaboración de papel y telas (plastificante, suavizante, humectante), en la industria química (fabricación de explosivos, anticongelantes, surfactantes, lubricantes, resinas alquídicas para tintas, pinturas y barnices, polioles de base poliéter para obtener poliuretano) (Ayoub y Abdullah, 2012).

En los últimos años, el incremento significativo de la producción de biodiésel tanto a nivel mundial como en el país, y particularmente en la región del Gran Rosario, está provocando una importante caída en los precios del glicerol crudo a nivel del mercado debido al exceso de producción. Para 2016, el mercado de mundial se estima en 140 mil millones de litros, lo que significa 14 mil millones de litros de glicerol crudo disponible (Fan y col., 2010). Además, por ser una materia prima económica y al mismo tiempo proveniente de combustibles alternativos, se

posiciona como un compuesto altamente valorizable y enormemente atractivo para su transformación hacia diferentes compuestos con alto valor agregado y/o energético, diversificando aún más las posibles utilidades en la industria.

En la actualidad existen un gran número de investigaciones aplicadas a la utilización del glicerol proveniente de la industria del biodiésel, para la producción de una importante variedad de compuestos de elevado valor para la industria. Los principales productos generados y reacciones involucradas son mostrados en la **Figura 2.8**, destacándose la deshidratación (producción de acroleína, acetaldehído, formaldehído, hidroxiacetona, 3-hidroxi propionaldehído, metanol, etanol); oxidación (dihidroxiacetona o DHA, gliceraldehído, ácidos glicérico, hidroxipirúvico, glicólico, tartrónico, oxálico, mesaoxálico y fórmico); hidrogenólisis (principalmente 1,2-PDOL, 1,3-PDOL y etilenglicol; PDOL = propanodiol); deoxigenación (1,3-PDOL, 1,2-PDOL, n-propanol e i-propanol) (Len y Luque, 2014); oxideshidratación (obtención de ácido acrílico) (Shen y col., 2014) e hidroclicación directa (obtención de 1,3-dicloro-2-propanol, intermediario en la síntesis de epicloridrina) (Charwath, 2013). El 1,2-PDOL sirve de bloque estructural para fabricación de poliésteres biodegradables, anticongelantes o solventes, mientras 1,3-PDOL es componente de polímeros biodegradables, resinas, refrigerantes y tintas (Huang y col., 2008). La industria de los polímeros ha incorporado al glicerol como materia prima de relevante interés para la producción de carbonato y dicarbonato de glicerol por carboxilación, importantes compuestos intermediarios empleados en la obtención de glicidol y síntesis de polímeros, siendo además de utilidad en fabricación de solventes, resinas, agroquímicos y surfactantes (Len y Luque, 2014). También se emplea al glicerol en reacciones de eterificación para la producción de poligliceroles (principalmente diglicerol y triglicerol) y derivados, los cuales tienen aplicación en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica (Gholami y col., 2014).

Otra alternativa interesante consiste en transformar glicerol hacia compuestos que sirvan como aditivos de combustibles fósiles o no fósiles. La reacción de glicerol con aldehídos o cetonas permite obtener acetales, cetales y acetatos que pueden ser directamente incorporados al biodiésel; tienen la capacidad de mejorar las propiedades de combustión por tratarse de compuestos oxigenados y contribuir a la disminución de las emisiones de CO₂ (Giraldo y col., 2008). Las reacciones de esterificación de glicerol con ácido o anhídrido acético genera mezcla de diacetinas (mono-, di- y tri-), las que mostraron una reducción a la mitad de las emisiones gaseosas contaminantes al ser incorporadas al biodiésel (Len y Luque, 2014).

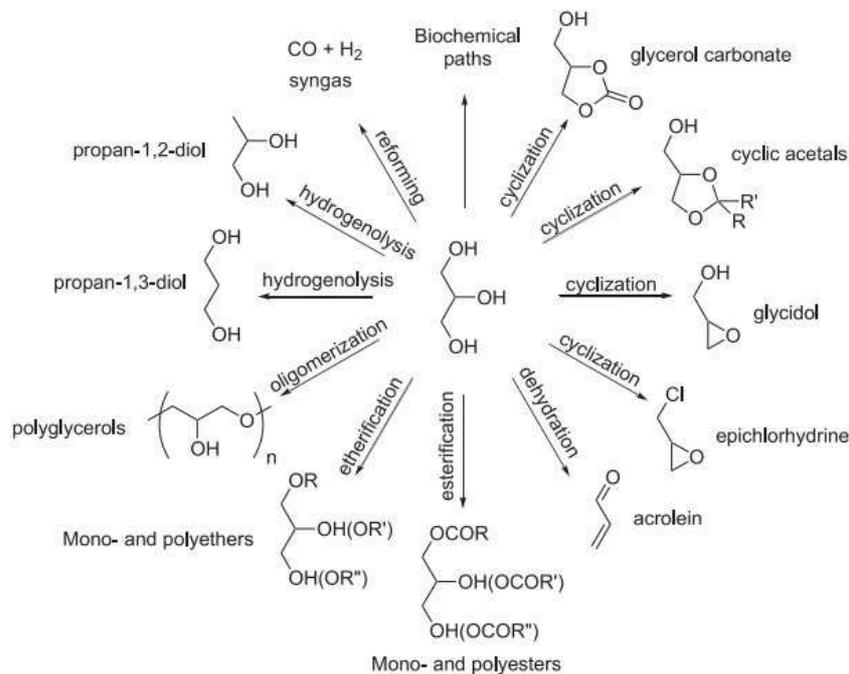


Figura 2.8: Principales vías de transformación del glicerol hacia productos de alto valor agregado y/o energético (Len y Luque, 2014).

Otras opciones involucran la transformación del glicerol en ésteres de glicerol, por esterificación con ácidos carboxílicos o transesterificación con ésteres, o bien en éteres, por eterificación con olefinas ligeras o alcoholes alquílicos; éstos últimos contribuyen a disminuir la emisión de partículas, hidrocarburos, CO y aldehídos, mejoran el flujo del biodiésel y reducen su viscosidad, y pueden ser agregados a naftas, diesel y biodiésel (Izquierdo y col., 2012). Debido al incremento en la demanda mundial de metanol y en los volúmenes de glicerol provenientes del biodiésel, un desafío interesante sería desarrollar tecnologías más eficientes basadas en la producción de metanol a partir del glicerol, lo que posee ventajas relacionadas a su uso directo en la producción del biodiésel (transformación de un subproducto de reacción en un compuesto que vuelve a usarse en el proceso) y en su obtención de manera renovable (proviene de biomasa y es menos contaminante que el proveniente de combustibles fósiles) (van Bennekom y col., 2012a).

Si bien existen procesos de transformación de glicerol que se encuentran en etapa de investigación a pequeña escala, muchas de las tecnologías anteriormente descritas han sido aplicadas y optimizadas en diseños a gran escala, utilizando principalmente sistemas de flujo continuo, lo cual ofrece importantes ventajas para su inmediata aplicación en la industria, y al mismo tiempo contribuye a desarrollar procesos más económicos, limpios y sostenibles (Len y Luque, 2014).

2.5 Hidrógeno

El hidrógeno es el elemento químico más simple y abundante del universo, constituyendo más del 75% de la materia visible, encontrándose principalmente en forma atómica y en estado de plasma. Bajo condiciones normales de presión y temperatura, el hidrógeno existe como gas diatómico, es decir H_2 . Sin embargo, el hidrógeno gaseoso es extremadamente poco abundante en la atmósfera de la Tierra, debido a su pequeña masa que le permite escapar al influjo de la gravedad terrestre más fácilmente que otros gases más densos. Por este motivo, los átomos simples y moléculas diatómicas de hidrógeno son difíciles de producir, concentrar y purificar en la Tierra. Este compuesto se combina fácilmente con otros elementos químicos, y la mayor parte se encuentra en compuestos tales como hidrocarburos, agua y alcoholes (Miessler y col., 2014), así como en biomasa natural, que incluye plantas y animales. Debido a esta razón, el H_2 se considera como un portador o vector de energía y no como una fuente de energía (Pino Priego, 2009).

El H_2 puede producirse a partir de diferentes materias primas, siendo utilizadas preferentemente las no renovables (recursos naturales que no pueden restaurarse o que son consumidos a mayor velocidad que su regeneración) y en menor medida las renovables (consideradas inagotables), como presenta la **Figura 2.9**. En las no renovables se encuentra gas natural, petróleo, carbón y uranio (nuclear), mientras que entre las renovables se destacan la biomasa, solar, eólica, hidroeléctrica y geotérmica. La mayor parte de la producción de H_2 es obtenida "in situ", es decir, en el lugar y momento en que se necesita para un proceso o en la generación de energía. Sin embargo, un rasgo que lo hace más atractivo que la electricidad y lo coloca a la par de los combustibles fósiles, es que puede ser almacenado en recipientes y condiciones especiales para su posterior utilidad. En la actualidad, la producción de H_2 es de unas 55 mta, con un consumo que mantiene un incremento anual de aproximadamente 6% (Kalamaras y Efstathiou, 2013). Cerca de 48% de la demanda mundial de H_2 se genera a partir de reformado con vapor del gas natural, 30% a partir de gases producidos del reformado de petróleo y naftas en refinerías e industria química, 18% a partir de gasificación de carbón, 3,9% mediante electrólisis del agua, y 0,1% desde otras fuentes (**Figura 2.10**) (Muradov y Veziroglu, 2005). Esto demuestra que cerca del 96% de la producción actual es obtenida a partir de alimentaciones basadas en combustibles fósiles, agotables en un futuro próximo, y que producen emisiones de gases de efecto invernadero (CO_2 , COVs, N_yO_x , SO_x).

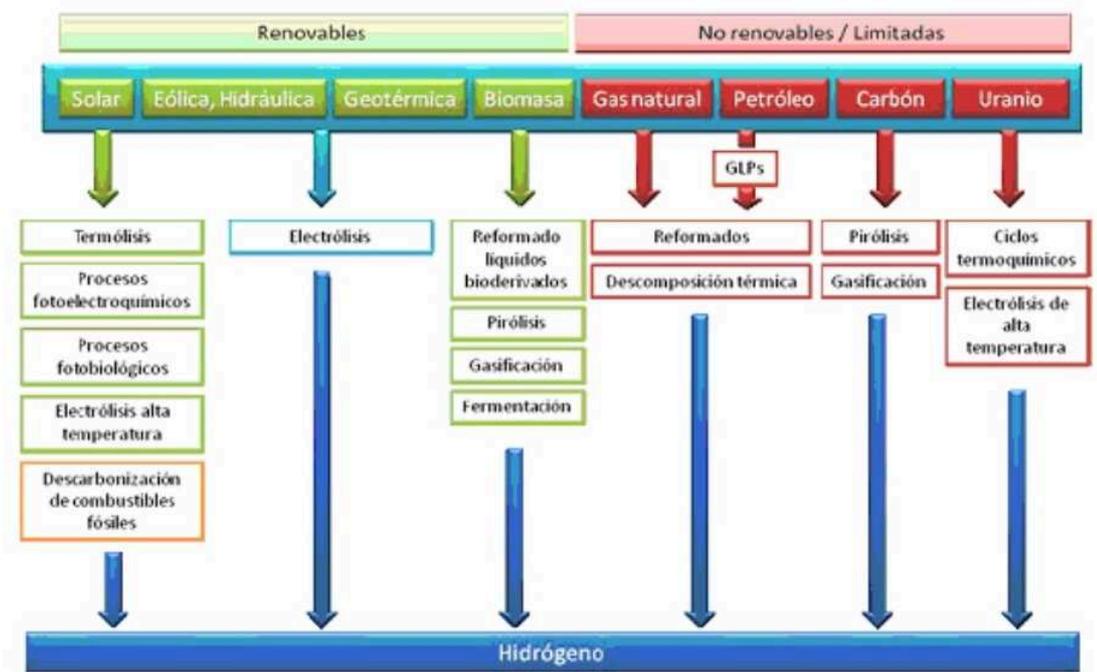


Figura 2.9: Principales procesos utilizados para la producción de H_2 , agrupados según el tipo de fuente de energía primaria de partida (Pino Priego, 2009).

Dentro de los usos convencionales, el H_2 sirve de insumo para numerosas aplicaciones en diferentes sectores (**Figura 2.10**), tales como la industria química (síntesis de amoníaco y metanol, procesos de hidrogenación en refinería, síntesis orgánica e inorgánica, así como hidrogenación, hidropirólisis y/o gasificación del carbón); siderúrgica (el mineral de hierro puede ser reducido empleando coque o un gas que contenga hidrógeno, monóxido de carbono, o mezclas de éstos); metalúrgica (como agente reductor y en procesos de producción de metales no férricos); procesamiento de metales (procesos de corte y soldadura de metales); del vidrio (tratamientos superficiales y en atmósferas especiales para templado, sinterización y fusión); alimenticia (hidrogenación de aceites y grasas vegetales y animales); y en otras aplicaciones como la producción de semiconductores, tratamiento de agua, generación de llamas de elevada temperatura o plasmas, combustible aeroespacial y refrigerante (H_2 líquido) (San Miguel y col., 2006). Los principales usos energéticos del H_2 son en combustión directa (proceso que puede utilizar catalizadores o no, y los gases de combustión producidos son enviados directamente a una turbina de gas o a un ciclo combinado turbina de vapor-turbina de gas para la generación de electricidad) y en motores de combustión externa e interna (principalmente para vehículos de transporte terrestre, aéreo y marítimo) (San Miguel y col., 2006).

Según datos del 2013, el mayor consumo de H_2 a nivel mundial se produjo en la región de Asia/Pacífico (33%, principalmente China), seguido por América del Norte (30%, principalmente EUA), Europa Occidental (20%) y el resto del mundo (20%) (Freedonia Group, 2014). El pronóstico actual indica que el consumo mundial de H_2 aumentará a una tasa de 3,5% anual hasta 2018, impulsado por el fuerte crecimiento de las operaciones de refino de petróleo (hidrotratamiento e hidrocraqueo), para abastecer principalmente a las industrias que lo utilizan directamente en sus procesos productivos, y al creciente parque de vehículos con celdas de combustible.

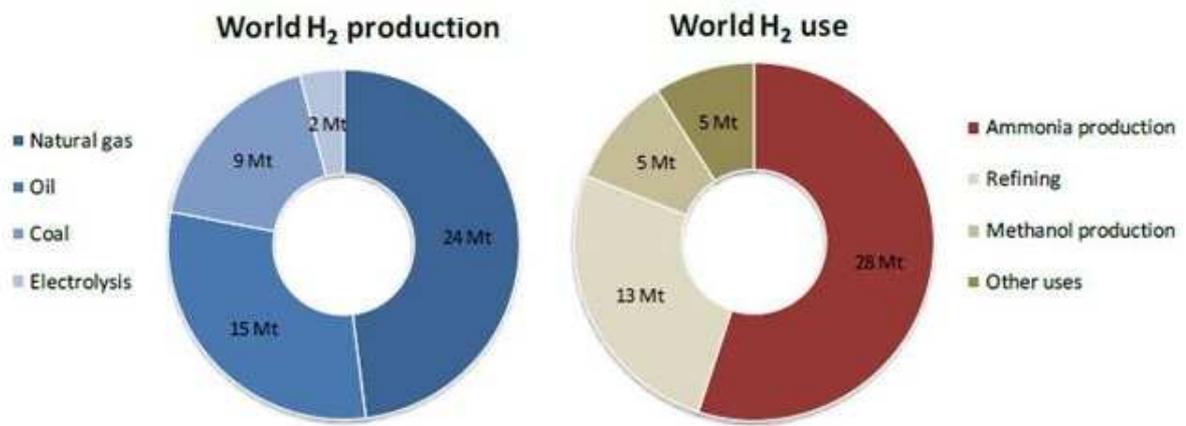


Figura 2.10: Producción y consumo mundial de H_2 , en mta (Muradov y Veziroglu, 2005).

En los últimos años, han sido cada vez más evidentes los avances relacionados a la investigación, desarrollo y producción de celdas de combustible, las cuales son aplicadas a la generación de energía en la industria, hogares y transporte. En los procesos convencionales, la energía química del combustible se transforma en energía térmica, luego en mecánica (turbina o motor) y finalmente en eléctrica. En las celdas, en cambio, se pasa directamente de energía química a eléctrica, y el combustible y oxidante no reaccionan en un proceso de combustión, sino que reaccionan por etapas en electrodos separados (San Miguel y col., 2006). Por tanto, el H_2 puede ser utilizado como combustible en las celdas tradicionales de tipo poliméricas o de membrana intercambiadora de protones (PEFC o PEMFC), de óxido sólido (SOFC), de carbonatos fundidos (MCFC), de ácido fosfórico (PAFC), y de electrolito alcalino (AFC), así como celdas de reciente aplicación y diseño como cerámicas (PCFC), de zinc (ZAFC) y biológicas (BFC) (Aguirre Guevara, 2013).

Si bien uno de los usos más prometedores se encuentra en aplicaciones móviles, es decir vehículos para transporte terrestre, también se ha logrado

implementarlo en la propulsión de barcos y submarinos, así como en naves espaciales y avionetas experimentales, lo que surge como consecuencia ante la necesidad creciente de disponer de vehículos más eficientes en el uso de la energía y más limpios en sus emisiones. Otros usos se observan en aplicaciones estacionarias, es decir en sistemas y plantas de producción de energía eléctrica, donde se pueden emplear celdas que operan a baja temperatura (menor tiempo de puesta en marcha, sirven para suministro de energía en zonas aisladas, rurales o montañosas a las cuales no es rentable llegar con tendido eléctrico) y alta temperatura (posibilidad de co-generación, es decir obtención simultánea de energía eléctrica y térmica, para alimentar viviendas, edificios de oficinas y fábricas, con posibilidad de entregar el exceso de energía a la red cuando ésta no es consumida). Estas celdas pueden emplearse en sistemas de energía de emergencia, de apoyo a la red eléctrica y alimentación ininterrumpida, en equipos de telecomunicaciones y pequeños aparatos para calefacción doméstica. En menor medida, los usos en aplicaciones portátiles están siendo investigados, pudiendo servir como fuentes de alimentación en equipos electrónicos portátiles y de pequeño tamaño que presentan bajo consumo (San Miguel y col., 2006).

El futuro del empleo del H_2 como combustible depende del avance en cuatro áreas claves: las fuentes de suministro (debe producirse empleando electricidad proveniente de fuentes sustentables, como eólica, solar y biomasa); infraestructura (debe distribuirse a través de gasoductos y tanques dentro de una red de estaciones de servicio); sistema de almacenamiento (para aplicaciones móviles, debe presentar una autonomía de cientos de kilómetros entre estaciones de servicio); y celdas de combustible (debe ocurrir un proceso alta eficiencia para obtener energía eléctrica a partir del H_2) (Rodríguez, 2013). En ciertos países de la UE, Canadá, EUA y Japón, existen estaciones de venta de H_2 para vehículos terrestres, así como vehículos de transporte urbano que utilizan este gas como combustible. Junto con ello, existen proyectos viables de aplicación para la creación de hidrógenoductos para el suministro y distribución de H_2 cercana a autopistas, con la finalidad de instalar estaciones de suministro a lo largo del sistema para alimentar vehículos con celdas de combustible (Botas y col., 2005). En el caso de Argentina, existe una planta de producción de H_2 a partir de energía eólica en la Patagonia, sin embargo la misma ha sido instalada con fines de investigación y desarrollo. En 2006 se sancionó la Ley de Hidrógeno, la cual tuvo como finalidad incentivar la aplicación de tecnologías que permitan la utilización del H_2 como

combustible, desde la instalación de plantas generadoras de energía eléctrica (estacionarias) hasta el desarrollo de equipos que permitan su utilización en vehículos (móviles) (Cámara de Diputados y Senadores, 2006b). Sin embargo, el crecimiento de la tecnología del H_2 en el país fue casi nulo, quedando la mayor parte en desarrollos y proyectos experimentales. Esto desaprovecha el potencial del país en la generación de dicho gas a partir de fuentes renovables, pues Argentina cuenta con características inigualables en cuanto a recursos naturales: presenta excelentes regiones para incorporar parques solares (el 100% del territorio nacional tiene una irradiación óptima durante cinco meses al año); posee un amplio sector para explotar recursos eólicos (70% del territorio presenta velocidad media anual de viento superior a 6 m s^{-1}); y tiene importantes aéreas de disponibilidad de biomasa (alrededor del 40% del país puede brindar recursos sin interferir en la producción de biocombustibles, bioetanol y alimentos) (Rodríguez, 2013).

En consecuencia, el H_2 como vector energético tendrá un protagonismo cada vez mayor, y la economía del H_2 responderá a un futuro en el cual este compuesto se genere de forma limpia y económica, donde su combustión no producirá residuos, alimentando gran parte de las necesidades energéticas, y reduciendo la incesante dependencia de los combustibles fósiles no renovables, la contaminación ambiental y la emisión de gases de efecto invernadero (Botas y col., 2005).

2.6 Gas de síntesis

Se conoce como GS a la mezcla de gases H_2 y CO , que suelen obtenerse en proporciones variables. El GS es químicamente diferente a los gases normalmente producidos por procesos de gasificación a baja temperatura. El GS crudo contiene cantidades considerables de CO_2 y H_2O , y en menor medida hidrocarburos como CH_4 y gases como N_2 (van der Drift y Boerrigter, 2005).

Las principales vías de producción refieren a la aplicación de procesos catalíticos a elevada temperatura (gasificación), partiendo de materias primas que preferentemente contengan carbono e hidrógeno en su estructura, siendo utilizadas principalmente fuentes no renovables (agotables), y en menor medida renovables (consideradas inagotables). Entre las no renovables, el GS puede ser obtenido a partir del gas natural, naftas, carbón y hulla, mientras que entre las renovables se destacan biomasa y biogás, siendo este último una mezcla de CH_4 (55-75%) y CO_2 (25-45%), con otras impurezas (Ocsachoque, 2012). Al igual que H_2 , la mayor parte

de la producción de GS es obtenida "in situ", en el lugar y momento en que es aplicado al proceso, y puede almacenarse en recipientes para uso posterior.

Dentro de las principales aplicaciones, el GS sirve de insumo para numerosas aplicaciones en la industria química y del refino del petróleo (**Figura 2.11**). Gran parte del GS generado se destina a la producción de H₂ mediante un proceso combinado de reformado con vapor, reacción de intercambio gas-vapor de agua (WGS) y purificación. Del total de este gas, una proporción es destinada a la síntesis de amoníaco y a la utilización en procesos de hidrotratamiento e hidrogenación que se llevan a cabo en las refinerías. Además de la producción de H₂, el GS se emplea principalmente en síntesis catalítica de metanol (pudiendo generar luego varios compuestos derivados del alcohol), para la producción de hidrocarburos líquidos a través de la reacción de Fischer-Tropsch (querosene, naftas, gasoil, ceras) y en la obtención de gas natural sintético mediante la metanación del GS (Talmadge y col., 2013). También se emplea en la producción de alcoholes y aldehídos de cadena larga, por medio de la reacción del GS con olefinas (reacción de hidroformilación o síntesis oxo), así como en la síntesis de un gran número de compuestos químicos mediante reacciones con CO (carbonilación del metanol) generando formaldehído, ácido acético, tolueno, isobutano, etanol, etileno, etilenglicol, y otros compuestos altamente valorizables para la industria. Una porción de la producción total de GS se destina a la generación de energía (calderas, turbinas de vapor, motores de combustión interna y celdas de combustible) y a otras aplicaciones menores (Rostrup-Nielsen y col., 2002).

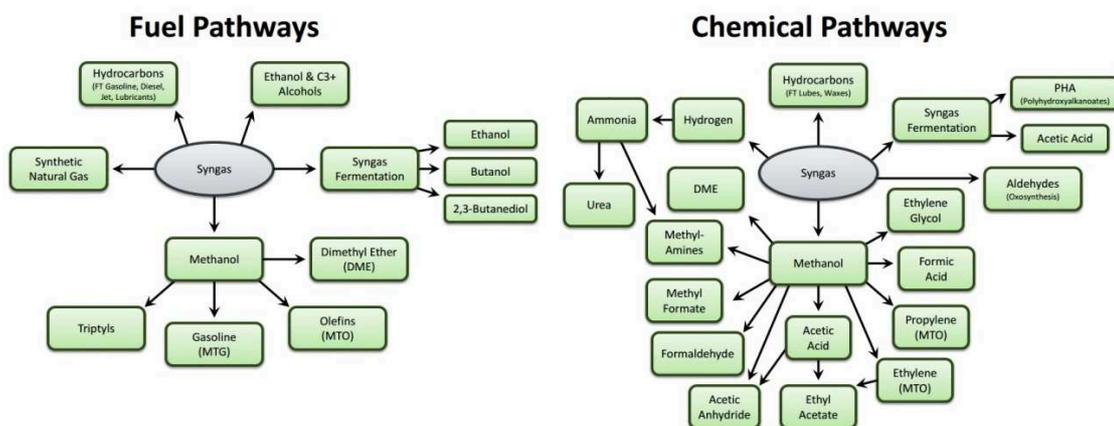


Figura 2.11: Principales vías de transformación de GS (izquierda, hacia combustibles; y derecha, hacia químicos), los cuales corresponden a compuestos de alto valor agregado y/o energético (Talmadge y col., 2013).

Durante el proceso de obtención de GS, la relación H_2/CO puede ser ajustada a los valores requeridos en relación al tipo de compuesto requerido en la siguiente etapa de producción (**Figura 2.12**), pudiendo variar desde valores muy bajos (menores o iguales a 1) hasta valores altos (superiores a 50) para el caso de procesos más exigentes, como la utilización de H_2 para la producción de amoníaco y su aplicación en celdas de combustible. Para este último caso, incluso pequeñas concentraciones de gases, como CO y CO_2 , producen problemas relacionados al envenenamiento de los materiales en el ánodo y cátodo de las celdas.

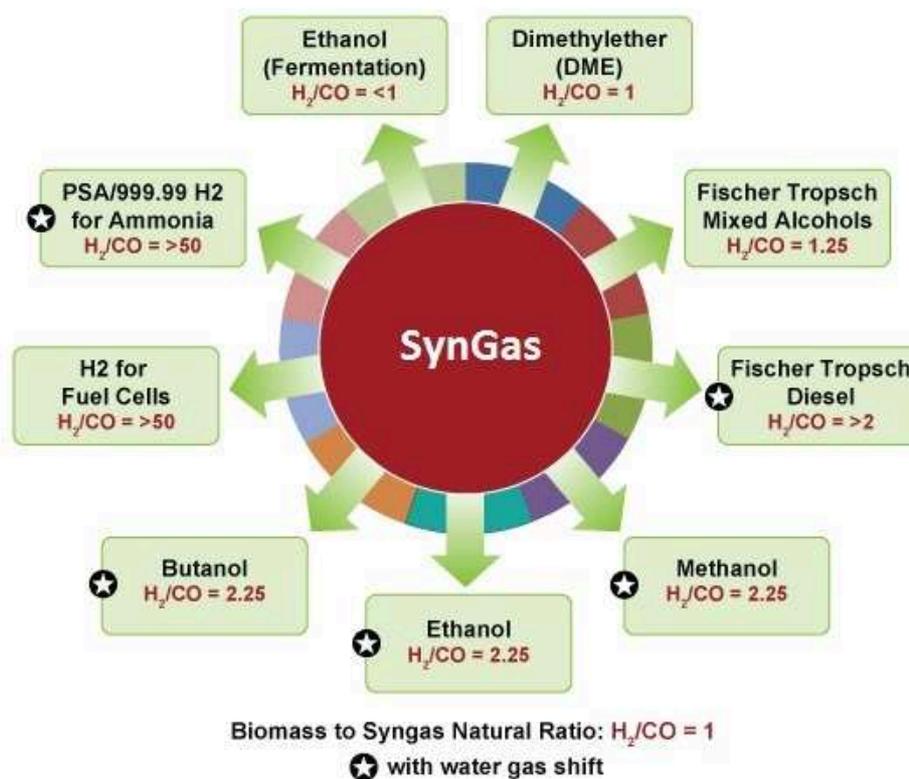


Figura 2.12: Relaciones de GS más utilizadas en la industria, para la obtención de una variedad de compuestos mediante diferentes procesos productivos. La estrella indica la utilización de la reacción de WGS (Infiniti Research Group, 2014).

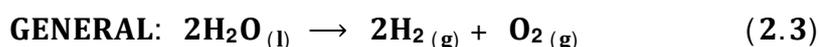
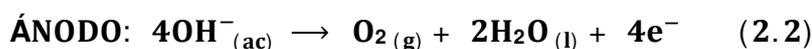
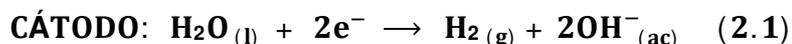
El mercado global del GS está creciendo a una tasa promedio anual del 8,5%, siendo utilizado en cuatro aplicaciones principales, que son la obtención de productos químicos (42%), combustibles líquidos (32%), generación de energía (19%) y combustibles gaseosos (7%) (Infiniti Research Group, 2014). En el futuro próximo, el GS será cada vez más importante para la producción de combustibles limpios a partir de compuestos derivados de biomasa, lo que permitirá cumplir con las estrictas normas de emisiones a nivel mundial. El enorme mercado potencial para esta mezcla se evidencia al observar que más del 20% del consumo de

energía primaria mundial ocurre en el sector de combustibles para transporte, mientras que si se incorpora el sector químico, este potencial podría superar ampliamente el 30% (Infiniti Research Group, 2014). Aunque en la actualidad la obtención de productos químicos sigue representando la mayor parte del mercado del GS, su uso en la producción de combustibles está creciendo a un ritmo sostenido, lo que permitirá colocarlo en una posición de privilegio dentro del campo de las energías renovables en los próximos años.

2.7 Procesos químicos

2.7.1 Electrólisis

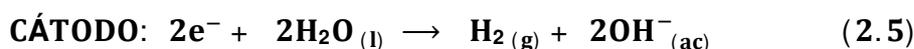
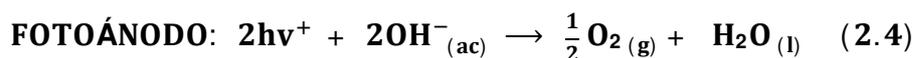
Un método prometedor para la producción de H₂ en el futuro podría ser la electrólisis del agua. En la actualidad, el 4% del H₂ generado en todo el mundo es producido por este proceso (Konieczny y col., 2008). La electrólisis consiste en el paso de una corriente eléctrica a través de dos electrodos sumergidos en una solución de un electrolito en agua, produciendo la ruptura de los enlaces químicos presentes en dicha molécula para generar H₂ y O₂:



Un electrolito usado comúnmente es el ácido sulfúrico, y los electrodos son de platino (Pt), el cual no reacciona con el ácido sulfúrico. El proceso se realiza a temperatura y presión ambiente. Si la energía eléctrica empleada en el proceso proviniese de energías renovables, las emisiones de gases de efecto invernadero serían casi nulas, mejorando el panorama climático actual (Aguirre Guevara, 2013). Sin embargo, en comparación con otros métodos, la electrólisis del agua es una tecnología muy exigente de energía. La eficiencia energética de la electrolisis (relación entre la energía química adquirida y la energía eléctrica suministrada) alcanza el 50-70% (Turner y col, 2008). Se trata esencialmente de la conversión de energía eléctrica en química (H₂), generando O₂ como subproducto industrial útil. Existen variaciones del proceso, donde se modifican las condiciones de trabajo (electrólisis a alta temperatura) o se perfeccionan los electrodos (electrocatalisis), sin embargo todavía se encuentran en etapas de investigación.

2.7.2 Fotelectrólisis

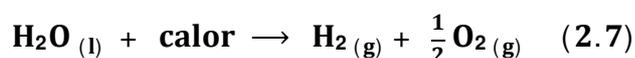
La fotelectrólisis del agua es un proceso de producción de hidrógeno a partir de recursos renovables, con eficiencia y costo prometedor, aunque todavía se encuentra en fase de desarrollo experimental (Hamelinck y Faaij, 2002). El proceso se basa en la presencia de un fotoelectrodo, un dispositivo de tipo semiconductor que absorbe la energía solar y simultáneamente genera el voltaje necesario para lograr la descomposición directa de la molécula de agua en hidrógeno y oxígeno:



La reacción depende del tipo de material semiconductor y de la intensidad solar, que produce una densidad de corriente entre 10 y 30 mA cm⁻². En estas densidades de corriente, el voltaje necesario para producir la electrólisis del agua es de aproximadamente 1,35 V. El fotoelectrodo está compuesto por capas catalíticas, fotovoltaicas (semiconductor que absorbe la luz) y protectivas, y cada una de ellas influye en la eficiencia global del sistema fotoelectroquímico. Las capas catalíticas afectan el rendimiento de la electrólisis y requieren catalizadores adecuados para la disociación del agua; las capas fotovoltaicas definen la absorción de la luz y semiconductores con bandas anchas ofrecen el potencial necesario para disociar el agua (Turner y col, 2008); y las capas de protección deben impedir la corrosión del semiconductor en presencia del electrolito acuoso y ser altamente transparente para dejar pasar la máxima cantidad de energía solar hacia las capas fotovoltaicas (Pino Priego, 2009). Este proceso todavía se encuentra en etapa de investigación.

2.7.3 Termólisis

La termólisis del agua consiste en disociar la molécula en hidrógeno y oxígeno utilizando solamente calor (Steinfeld, 2005). Esta disociación térmica del agua se realiza en un solo paso, según la ecuación:

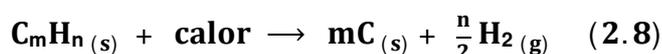


En este proceso, se utilizan temperaturas superiores a los 2800 °C para lograr la descomposición del agua, logrando una eficiencia energética global cercana al 50% (Funk, 2001). Aunque esta reacción es aparentemente muy sencilla, presenta dos graves inconvenientes que dificultan su desarrollo. Por un lado, las elevadas temperaturas que son necesarias para conseguir un grado de disociación razonable, dan lugar a problemas de materiales y al aumento de las pérdidas por radiación, disminuyendo la eficiencia de absorción, por lo que debe contarse con materiales estables a alta temperatura y con fuentes de calor sostenibles. Por otro lado, la necesidad de contar con una técnica eficiente de separación del H₂ y O₂ generado para evitar una mezcla explosiva, lo cual se puede lograr empleando membranas semipermeables basadas en materiales resistentes a altas temperaturas. Se ha propuesto emplear reactivos químicos para reducir la temperatura y mejorar la eficiencia térmica, sin embargo esto requiere presiones más altas (Pino Priego, 2009). Al igual que la fotoelectrólisis, es un proceso que todavía se encuentra en etapa de investigación.

2.8 Procesos catalíticos

2.8.1 Pirólisis

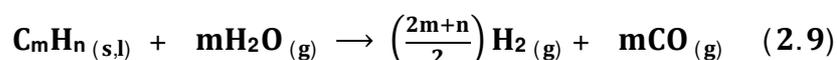
La pirólisis consiste en la descomposición de un combustible sólido (carbón o biomasa) mediante acción del calor (normalmente a presiones entre 0,1-0,5 MPa y temperaturas entre 500-900 °C) (Demirbas y Arin, 2004). El proceso ocurre en ausencia de O₂ y aire, por lo que no produce dioxinas ni furanos. Los soportes más utilizados en la preparación de catalizadores para este proceso son sólidos porosos ácidos, materiales mesoporosos ordenados y zeolitas (García y col., 2005). Los productos finales dependen de la naturaleza del combustible, temperatura y presión de operación, y los tiempos de residencia del material. Estos pueden ser gaseosos (H₂ e hidrocarburos), líquidos (hidrocarbonados) y sólidos (residuos carbonosos o coque) (Pino Priego, 2009). Este proceso ofrece una reducción significativa de emisiones de gases contaminantes, permite obtener un subproducto sólido con un mayor contenido de carbono (más limpio), y puede emplear diversos materiales de partida (Demirbas, 2005). La reacción puede describirse según:



La pirólisis rápida es uno de los procesos recientemente desarrollados para la transformación del material orgánico en productos con un mayor contenido de energía, que suelen encontrarse en todas las fases (sólido, líquido y gaseoso) (Pino Priego, 2009). El uso de catalizadores en estos procesos permite disminuir la temperatura de trabajo e incrementar el rendimiento a ciertos gases de interés (Arabiourrutia y col., 2010). Puesto que pueden generarse bajas cantidades de CO y CO₂, es importante controlar la reacción para que se produzca un GS enriquecido en H₂, de mayor utilidad en la industria. Los procesos de pirólisis se encuentran desarrollados y son factibles de ser empleados a escala comercial.

2.8.2 Gasificación

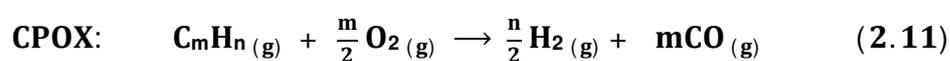
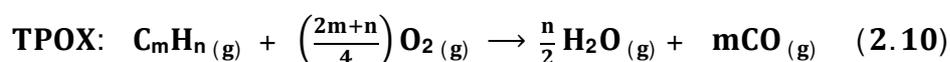
La gasificación del carbón, fracciones pesadas del petróleo y biomasa, es un proceso que consiste en una combustión en presencia de un agente gasificante, para obtener CO, CO₂, H₂, CH₄, C₂ (etano) y C₃ (propano), además de residuos líquidos y sólidos, y cuya distribución depende de las condiciones empleadas. Los residuos sólidos son fundamentalmente carbón y sales minerales (cenizas), y los líquidos son agua y alquitranes (Santa Cruz y col., 2009). La principal reacción es:



Esta tecnología es una variación de la pirólisis, empleando temperaturas entre 700 y 1500°C, pudiendo realizarse en ausencia o presencia de catalizador. El uso de catalizadores introduce mejoras en cuanto a la posibilidad de trabajar a menor temperatura (500-700°C, utilizando zeolitas o dolomita), incrementar el volumen de gases producidos (cracking de residuos líquidos y parte de los sólidos), disminuir la formación de alquitranes y otros residuos (mediante catalizadores de reformado con metales Ni o Co), y generar mayor rendimiento energético (Furusawa y Tsutsumi, 2005; Li y col., 2010a). El agente gasificante puede ser aire, aire enriquecido con O₂, O₂ o vapor de agua, lo que permite obtener diferentes mezclas de gases con diferentes utilidades en la industria. La adición de O₂ y/o vapor generan GS con relación H₂/CO alrededor 2/1, la cual puede utilizarse directamente como materia prima en la reacción Fischer-Tropsch, generando hidrocarburos superiores (naftas y diesel sintético), o alimentar un reactor WGS para producir H₂ (Asadullah y col., 2002). La gasificación de biomasa y carbón son tecnologías maduras, empleadas comercialmente en industria química, petroquímica y de producción de energía.

2.8.3 Oxidación parcial (POX)

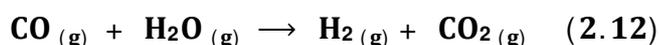
La oxidación parcial consiste en una oxidación incompleta de un hidrocarburo, por ejemplo gas natural o biogás, donde se oxida el carbono (hasta CO), quedando libre el H₂. La reacción puede realizarse con o sin catalizadores, empleando O₂ puro o aire. Durante la oxidación parcial no catalítica (TPOX), la materia prima se gasifica en presencia de O₂ a temperaturas en el rango 1300 a 1500 °C y presiones entre 3-8 MPa. Debido a que se produce más CO (H₂/CO = 1/1 o 2/1) que durante el reformado en fase gas (H₂/CO = 3/1), el proceso debe complementarse con la conversión de CO y vapor de agua en H₂ y CO₂ (Pino Priego, 2009). La mezcla gaseosa formada contiene H₂, CO, CO₂, H₂O, CH₄, sulfuro de hidrógeno (H₂S) y oxisulfuro de carbono (COS). En la oxidación parcial catalítica (CPOX), el uso de catalizadores (Fe, Co, Ni sobre Al₂O₃ modificada, óxidos mixtos, tierras raras) logró disminuir la temperatura de reacción (700-1000 °C). Sin embargo, la presencia de mayor concentración de CO y compuestos azufrados en el gas obtenido, conllevan a la deposición de carbón y al envenenamiento del catalizador, respectivamente, lo que reduce en gran medida la eficiencia del proceso (Pino Priego, 2009).



Aunque ambos procesos tienen costos económicos elevados debido a la etapa posterior de eliminación de CO, han sido propuestos para producir H₂ aplicable a celdas de combustible de automóviles y otros usos comerciales (Krummenacher y col., 2003). La eficiencia térmica de los sistemas industriales, empleando CH₄ como gas combustible, está en el intervalo de 60-75% (Semelsberger y col., 2004).

2.8.4 Reacción de intercambio gas-vapor de agua (WGS)

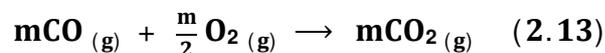
Durante un proceso típico de reformado, se obtiene una mezcla gaseosa de productos con concentraciones significativas de CO (5-10% v/v) (Song, 2002). Para aumentar la cantidad de H₂, el gas producto se incorpora a un sistema de reacción de intercambio gas-vapor de agua, disminuyendo el contenido de CO:



La reducción del contenido de CO en el gas de salida se consigue mediante un proceso de dos etapas, que implica una reacción de WGS a alta temperatura (proceso HTS) y otra a baja temperatura (proceso LTS). En la primera etapa, llevada a cabo entre 310-450 °C, la concentración de CO se reduce del 10 al 3% v/v. En la segunda etapa, llevada a cabo entre 180-250 °C, el contenido de CO se reduce a un nivel de 500 ppm (Rhodes y col., 2002). En ambos procesos, es habitual la utilización de catalizadores para favorecer la reacción, como Pt, Re, La, Cu soportados sobre ZnO, Al₂O₃, TiO₂, o combinaciones (Gonzalez y col., 2007).

2.8.5 Oxidación preferencial (PROX)

En caso que se desee reducir aún más el contenido de CO en el gas generado luego de realizar la reacción de WGS, se puede utilizar una oxidación preferencial (Song, 2002). El proceso PROX consiste en la reducción de CO hasta valores inferiores a 10 ppm, en un reactor catalítico mediante agregado de concentraciones precisas de O₂, pues la incorporación de este gas en exceso provoca la combustión del H₂, generando vapor de agua, y ocasionando la disminución del compuesto que se desea purificar (Song, 2002).

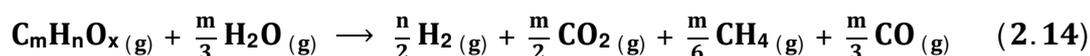


Los catalizadores empleados típicamente poseen metales nobles como Pt, Ru, o Rh sobre Al₂O₃ (Song, 2002). Actualmente, la oxidación preferencial es la técnica principal en desarrollo para la purificación del H₂, para que pueda ser utilizado en diferentes celdas de combustible (Pietrogrande y Bezzeccheri, 1993). Sin embargo, las desventajas de esta tecnología son su naturaleza exotérmica, junto con una ventana de temperatura de operación óptima muy estrecha, y con una elevada complejidad de instrumentación y control de procesos.

2.8.6 Reformado en agua supercrítica (SCW)

Se denomina reformado en agua supercrítica al proceso de transformación de un compuesto hacia diferentes gases (en ausencia de oxidantes), y que involucra la utilización de agua a temperatura y presión por encima de su punto crítico (T_c = 374 °C y P_c = 22,1 MPa). Con el aumento de la temperatura y presión, el agua se convierte en un oxidante fuerte y se produce la ruptura de la estructura del

compuesto de partida, por la transferencia de O₂ del agua a los átomos de carbono del sustrato. Como resultado, se produce preferentemente la oxidación hacia CO₂, y en menor medida hacia CO, mientras que los átomos de hidrógeno del agua y sustrato se liberan formando H₂. Durante éste proceso ocurren diversas reacciones laterales e indeseables, por lo tanto el proceso es generalizado en la siguiente ecuación para los principales compuestos obtenidos (van Bennekom y col., 2011):



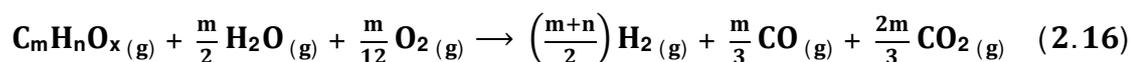
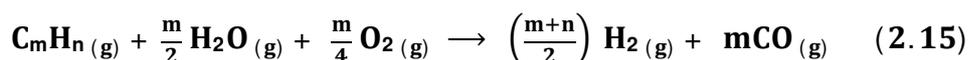
Los compuestos generados pueden ser fácilmente separados de la fase acuosa mediante enfriamiento del sistema a temperatura ambiente, y el gas obtenido a alta presión se encuentra enriquecido en H₂ (Markocic y col., 2013). Las propiedades fisicoquímicas del agua, tales como densidad, constante dieléctrica, producto iónico, capacidad calorífica y viscosidad difieren significativamente de las del agua en estado líquido o gaseoso (vapor). El aumento de la temperatura y presión afecta a estas variables, lo que produce cambios en la solubilidad y en los coeficientes de difusión de los compuestos disueltos, modificando los mecanismos de reacción (Guo y col., 2010). Por lo tanto, dependiendo de las condiciones de temperatura y presión, pueden ocurrir reacciones de radicales libres o bien reacciones polares e iónicas. El intercambio de calor entre las corrientes de entrada y salida del reactor es esencial para lograr una alta eficiencia térmica. La descomposición de la materia prima en SCW es un proceso rápido, con alta solubilidad de los compuestos intermedios (que inhibe la formación de alquitrán y coque), y produce elevados rendimientos a productos a temperaturas relativamente bajas (Kruse, 2009).

Varios tipos de compuestos provenientes de la biomasa han sido utilizados en reacciones de SCW, tales como celulosa, lignina, glucosa, y glicerol. Este último compuesto es un material prometedor para SCW, debido a que el glicerol crudo contiene agua y su conversión hidrotérmica se puede realizar sin secado previo (Markocic y col., 2013). Sin embargo, la presencia de sales (impurezas) en el glicerol crudo puede ocasionar problemas de precipitación en las paredes del reactor y tuberías durante la reacción de SCW, así como en la superficie del catalizador, reduciendo el área superficial efectiva y por ende su actividad. Por lo tanto, la extracción de las sales es una mejora muy importante para la utilización del glicerol crudo mediante esta tecnología (Peterson y col., 2008).

Numerosos trabajos describen el desarrollo de diferentes catalizadores para la mejora del proceso de conversión de glicerol mediante SCW. La producción de compuestos líquidos conlleva a la formación de productos intermedios, principalmente acroleína (Markocic y col., 2013). Fueron utilizados sulfatos o ácido sulfúrico para la deshidratación del glicerol, sin embargo estos catalizadores fueron difíciles de recuperar del efluente y ocasionaron problemas de corrosión y obstrucción del reactor. Empleando un catalizador comercial de 5% p/p de Ru sobre Al_2O_3 a 800°C , se obtuvieron rendimientos de H_2 cercanos al teórico y la gasificación fue completa aún a concentraciones de 40% p/p glicerol. Además, los rendimientos a H_2 aumentan directamente con la temperatura de operación y la formación de CH_4 se puede reducir al trabajar con tiempos de residencia bajos (Byrd y col., 2008). El aumento en la carga de Co en soportes YSZ (zirconio estabilizado con itrio) promovió la conversión de glicerol y el rendimiento a H_2 , encontrando resultados óptimos con una carga de 10% p/p Co (Pairojpiriyakul y col., 2013). La metanación fue promovida enormemente con $\text{Ni}/\text{CaO}-6\text{Al}_2\text{O}_3$, el cual tiene un gran potencial como catalizador para la producción de gas natural renovable (van Bennekom y col., 2012b). Los principales objetivos de los grupos de investigación residen en lograr aumentar la conversión del compuesto alimentado y la selectividad de la reacción al producto de mayor interés (H_2), lo cual depende fuertemente de las condiciones del proceso (van Bennekom y col., 2011).

2.8.7 Reformado autotérmico (ATR)

El reformado autotérmico consiste en un proceso de CPOX, al cual se incorpora vapor de agua (Holladay y col., 2009). El método combina el reformado en fase gas (endotérmico) y la oxidación parcial (exotérmico) en un mismo sistema (Joensen y Rostrup-Nielsen, 2002), generando un mejor balance energético. El proceso puede describirse de la siguiente manera, tanto para hidrocarburos como para biomasa:



Las reacciones emplean O_2 puro o aire y ocurren en lechos de catalizadores metálicos, a temperaturas que oscilan entre 800 y 1300°C . El principal objetivo es lograr una mayor producción de H_2 , con un mínimo contenido de CO. La oxidación

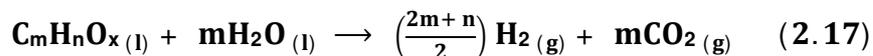
del 30 al 40% del material alimentado tiene lugar en el reactor y en presencia de O_2 , liberando calor y convirtiendo el material remanente en H_2 , CO_2 y CO , con generación de vapor de agua (Melon Peñalver, 2008). Este proceso tiene como ventaja no necesitar calor externo para ser operado, siendo más simple y menos costoso que el proceso de reformado en fase gas, pero ofrece menores niveles de eficiencia de reacción (65-75%) (Holladay y col., 2009). Otra ventaja es que el proceso ATR puede iniciarse rápidamente en relación al reformado en fase gas, y puede obtenerse una mayor cantidad de H_2 que empleando CPOX (Joensen y Rostrup-Nielsen, 2002). Existen buenas expectativas para que ATR se utilice en la industria de los combustibles para procesos como GTL, debido a la composición gaseosa favorable para su empleo en la síntesis de Fischer-Tropsch, su diseño compacto, un menor costo de capital inicial y el potencial para su escalado (Melon Peñalver, 2008). Sin embargo, estos procesos todavía no han alcanzado un estado de total desarrollo para su aplicación a escala industrial.

La utilización del glicerol en procesos de ATR a baja escala ha sido ampliamente reportada. El empleo de catalizadores de $Rh-Ce/Al_2O_3$ demostró alta selectividad a H_2 , y una mayor adición de vapor suprime la formación de CO (Dauenhauer y col., 2006). Al utilizar un catalizador $Ni/Pd/Cu/K$ sobre Al_2O_3 en el rango de $500-800^\circ C$, el rendimiento a H_2 aumenta al incrementar la temperatura de operación (Dauenhauer y col., 2006). Además, la adición de O_2 mejora las reacciones iniciales, permite la disolución del glicerol y disminuye la formación de precursores de depósito carbonoso, aumentando la producción de H_2 (Dauenhauer y col., 2006). En general, el empleo de altas temperaturas y elevada relación agua:glicerol, junto con baja relación O_2 :glicerol son los factores más adecuados para este proceso, mejorando la producción de H_2 (Authayanun y col., 2010). El empleo de una mayor relación agua:glicerol provoca aumento en la producción de H_2 y disminución en la formación de CO empleando glicerol crudo, aunque se obtiene un rendimiento inferior que con glicerol puro (Authayanun y col., 2010).

2.8.8 Reformado en fase líquida (APR)

El reformado en fase líquida es un proceso desarrollado para la generación de hidrocarburos oxigenados o compuestos provenientes de recursos renovables. La tecnología involucra ruptura de enlaces C-C y C-H para formar especies adsorbidas (especialmente CO) sobre la superficie del catalizador, para luego convertir el CO

en H₂ y CO₂ por la reacción de intercambio gas-vapor de agua (Manfro y col., 2011), siendo la reacción global para compuestos provenientes de biomasa:



El proceso ocurre mediante una única y simple etapa (Cortright, 2005), a temperaturas más bajas (200-270 °C) que el reformado en fase gas convencional (600-700 °C). La reacción de intercambio de gas-vapor de agua (WGS) es favorable a las bajas temperaturas del proceso, logrando minimizar las reacciones de descomposición indeseables. Así, en un único reactor, es posible generar H₂ y CO₂ con bajas cantidades de CO, a presiones de 15-50 kg cm⁻² que facilitan la posterior purificación del efluente rico en H₂ (Cortright, 2005). El reformado en fase líquida se realiza en condiciones de presión y temperatura suaves, mediante la utilización de catalizadores sólidos heterogéneos (Huber y Dumesic, 2006). Un adecuado catalizador para el proceso de APR debe ser activo en la escisión de enlaces C-C y la reacción de WGS, pero debe inhibir la escisión de enlaces C-O y las reacciones de metanación (Manfro y col., 2011). Las ventajas del proceso APR residen en la ausencia de vaporización previa, lo que representa un importante ahorro de energía en comparación con los procesos que vaporizan los reactivos, y es capaz de utilizar un reactor sencillo y una sola etapa de reacción, logrando bajos niveles de CO en la mezcla gaseosa producida (Pino Priego, 2009).

La mayoría de la investigación actual relacionada al reformado en fase líquida se centra en la utilización de catalizadores del Grupo VIII soportados, entre los que el Pt se destaca por tener la mayor actividad catalítica. Materiales basados en Pt soportado sobre MgO y ZrO₂ presentaron buena actividad y producción de H₂, con mínima producción de hidrocarburos no deseados, demostrando que la naturaleza del soporte influye en el rendimiento catalítico durante el APR de glicerol (Menezes y col., 2011). Utilizando Pt/Al₂O₃ preparada a partir de distintos precursores metálicos, el APR de glicerol puro alcanzó similar conversión (45%) y selectividad a H₂ (85%) para todos los materiales; mientras con glicerol crudo sus impurezas (sales inorgánicas, alcoholes) afectan fuertemente la actividad catalítica debido al envenenamiento y/o bloqueo de los sitios activos (Lehnert y Claus, 2008). Al incrementar la temperatura de 160 a 280 °C, la composición de H₂ disminuyó, mientras que conversión total de glicerol y producción de CO₂ aumentaron. Un catalizador con 3% Pt/C mostró adecuada selectividad a H₂ pero con actividad

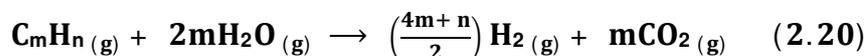
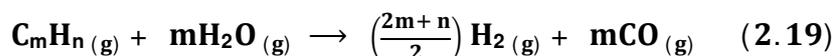
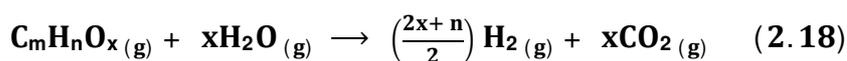
relativamente baja. La adición de Re aumentó la actividad del catalizador, lo que incrementó la velocidad de ruptura del enlace C-C, la conversión de glicerol y la productividad a H_2 ; sin embargo ocurrió una disminución en la selectividad a H_2 (King y col., 2010). En cuanto a la utilización de Pt o Ni en catalizadores monometálicos, se observó que ambos elementos son activos para catalizar la APR del glicerol, pero no presentan suficiente actividad para la conversión de glicerol hacia productos gaseosos. Por ello, el método más simple para lograr una adecuada actividad catalítica fue combinar ambos metales en un mismo catalizador, obteniendo mejor rendimiento durante la APR del glicerol (El Doukkali y col., 2012). La presencia de Pt en diferentes catalizadores demostró una mayor estabilidad, mientras que Ni evidenció significativa desactivación con el tiempo de operación y mayor formación de CH_4 (El Doukkali y col., 2012).

Aunque Ni posee una menor actividad, los catalizadores preparados con este metal han sido ampliamente evaluados debido a su bajo costo y amplia disponibilidad a escala industrial (Manfro y col., 2011). Materiales de Ni/CeO_2 mostraron gran potencial para ser utilizados en fase líquida, debido a su buena actividad y alta producción a H_2 , y menor formación de CH_4 que con Ni/Al_2O_3 . Sin embargo, la conversión de glicerol disminuye con el tiempo de operación debido a la oxidación de los sitios metálicos activos y a la deposición de residuos carbonosos (Manfro y col., 2011). Un tamaño de partícula más grande limita la disponibilidad relativa de la función metálica, lo que provoca que la actividad catalítica esté inducida principalmente por el soporte. Además, ha sido demostrado que la producción de ciertos compuestos en la fracción líquida durante APR podría deberse a reacciones bifuncionales, en las que participan tanto la fase metálica como el soporte (Wawrzetz y col., 2010). Muchos de los catalizadores ensayados no son estables durante reacciones prolongadas de varios días. Además, debido a que los rendimientos en APR son moderados en relación a su capacidad, los reactores tienden a ser grandes para su aplicación a una escala mayor. Las mejoras en la actividad y durabilidad de los catalizadores son los puntos en los cuales se necesita un avance significativo (Pino Priego, 2009).

2.8.9 Reformado en fase gas (SR)

2.8.9.1 Reformado en fase gas de combustibles fósiles

El reformado catalítico en fase gas es el proceso más desarrollado en la industria para la obtención de H_2 mediante la transformación de hidrocarburos. Las ventajas residen principalmente en la alta eficiencia de funcionamiento y los bajos costos de producción y operación, lo que lo transforma en el proceso menos costoso para su producción (Ogden y col., 1999). Las principales materias primas empleadas son gas natural, hidrocarburos ligeros, metanol e hidrocarburos oxigenados provenientes de la industria de refino del petróleo, lo que deja en evidencia la elevada dependencia existente sobre los combustibles fósiles no renovables y altamente contaminantes (Muradov y Veziroglu, 2005). Las reacciones que se producen durante el reformado en fase gas, partiendo de materias primas como hidrocarburos y metanol, son las siguientes (Rostrup-Nielsen, 2001):



Para el metanol y otros hidrocarburos oxigenados, el proceso catalítico consiste en la transformación directa de la materia prima hacia CO_2 e H_2 empleando vapor de agua (Ecuación 2.18); las temperaturas de reacción utilizadas son moderadas, alrededor de $200^\circ C$ (Farrauto y col. 2003). Para los hidrocarburos, el proceso completo consta de dos etapas. En la primera, la materia prima es mezclada con vapor de agua y se alimenta a un reactor catalítico, donde principalmente se produce un GS con bajo contenido de CO_2 (Ecuaciones 2.19 y 2.20) (Song y col., 2007); las temperaturas de reacción son superiores a $500^\circ C$ para la mayoría de los hidrocarburos convencionales (Farrauto y col. 2003). En la segunda etapa, el gas producido es enfriado (o condensado) e inyectado en un convertidor catalítico, donde el CO es principalmente convertido en CO_2 e H_2 mediante la utilización de vapor de agua, según ha sido descrito para el sistema de intercambio de gas-vapor de agua (Ecuación 2.12). De esta manera, se obtiene H_2 de alta pureza con una concentración superior al 99% (Song y col., 2007).

Debido a que la reacción de reformado en fase gas es endotérmica (utiliza energía), gran parte puede ser recuperada e introducida de nuevo al proceso. La cantidad de energía recuperada indica que la eficiencia térmica a escala industrial puede llegar hasta 90% en caso de emplear metanol como combustible de partida, debido a que la reacción de descomposición ocurre a menor temperatura y son bajas las pérdidas de calor por parte del sistema de reacción; esta es la principal característica del proceso de reformado en fase gas (Fábrega Ramos, 2009).

Debido a que los procesos catalíticos de reformado en fase gas requieren que las materias primas utilizadas no presenten compuestos azufrados en su estructura, las mismas son previamente desulfurizadas. Esto permite una menor desactivación del catalizador durante el proceso de reformado y una actividad más estable y prolongada durante el tiempo de operación (Pino Priego, 2009). Otro factor importante a tener en cuenta es la relación de átomos H/C en los materiales de partida, pues cuanto mayor sea esta relación, menores son las emisiones de CO₂ como subproducto de la reacción. La producción de CO₂ representa la principal desventaja de este proceso, obteniéndose alrededor de 7 kg de CO₂ por cada kg de H₂, convirtiéndolo en el principal subproducto de la reacción (Pino Priego, 2009).

Los catalizadores utilizados en los procesos industriales de reformado en fase gas se dividen en dos tipos: los que utilizan metales baratos (típicamente níquel) y aquellos que emplean metales más costosos, como los pertenecientes al Grupo VIII (en general Pt o Rh) (Pino Priego, 2009). Los elementos metálicos adicionados al soporte se utilizan con la finalidad de mejorar las características catalíticas, tales como la actividad y estabilidad, para lograr una mayor resistencia frente a la sinterización y deposición de carbón, incrementar las propiedades conductoras de los iones óxido que intervienen en el mecanismo de la reacción, y mantener el metal bien disperso y en el estado de oxidación adecuado. (Sánchez, 2011). Además de la primera especie metálica, a los catalizadores monometálicos se les incorporan numerosos promotores, con la finalidad de mejorar las características catalíticas y así minimizar la formación de carbón en la superficie, o facilitar o acelerar la eliminación del carbón depositado.

2.8.9.2 Reformado en fase gas de glicerol

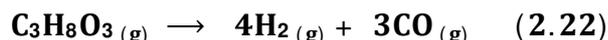
En los últimos años, la conversión de glicerol a H_2 mediante procesos catalíticos ha tomado un gran impulso, principalmente debido al notable crecimiento de la industria de producción de biodiésel, que trajo consigo un constante incremento en la disponibilidad de glicerol en el mercado global y una importante disminución en su costo. Esto permitió posicionar al glicerol como una materia prima prometedora y competitiva, que puede ser transformado en la industria para obtener numerosos compuestos con alto valor agregado y/o valor energético, siendo una opción de gran interés la producción de H_2 . Este compuesto juega en la actualidad un papel de gran relevancia en cuanto a la generación de energía, ya que no sólo es considerado un importante vector energético sostenible y renovable, sino que además es determinante respecto al mejoramiento de la calidad medioambiental en relación a los bajos niveles de contaminación generados durante los procesos de producción y combustión de H_2 . Junto con ello, el proceso de reformado en fase gas presenta mayor interés debido a la facilidad en el manejo de las características operativas del sistema y a la obtención de una eficiencia de reacción bastante superior que para el resto de los procesos catalíticos.

Numerosos estudios describen la variedad de reacciones que ocurren durante el proceso de reformado en fase gas del glicerol para la producción de H_2 , los cuales involucran diferentes mecanismos que favorecen la formación de productos intermediarios de mayor o menor valor, y que afectan la concentración y pureza del H_2 obtenido al final del proceso. Estos estudios se pueden clasificar principalmente en tres categorías: análisis termodinámicos y teóricos para dilucidar mecanismos de reacción, introducción de mejoras en el catalizador, y mayor eficiencia del proceso y optimización de los parámetros de operación (Chen y col., 2011).

2.8.9.2.1 Principales reacciones

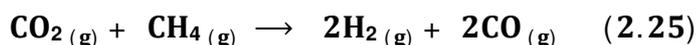
El incremento de los estudios termodinámicos y teóricos permitió comprender con mayor grado de detalle todas las reacciones involucradas en el mecanismo global de reformado en fase gas, facilitando la selección de diferentes condiciones de trabajo que permitan incrementar la producción de H_2 u otros compuestos de interés, y minimizar la aparición de reacciones laterales indeseables que producen compuestos indeseables o de bajo valor agregado para la industria (Dou y col., 2009). En general, las reacciones que tienen lugar durante este proceso son

altamente endotérmicas, y se requiere la presencia de un catalizador para acelerarlas y favorecer la producción de H_2 (Adhikari y col., 2008a). El reformado catalítico de glicerol en fase gas permite la obtención teórica de 7 moles de H_2 por cada mol de glicerol alimentado (Ecuación 2.21), que surge de la combinación entre la reacción de descomposición de glicerol hacia GS (Ecuación 2.22) y 3 veces la reacción de intercambio de gas-vapor de agua (Ecuación 2.12):



La ecuación 2.21 demuestra que la pureza del H_2 en el GS producido mediante reformado en fase gas del glicerol no puede exceder 70% (Dou y col., 2009). La reacción 2.12 es moderadamente exotérmica, que implica que la reacción es favorecida a baja temperatura; sin embargo, a mayor temperatura se incrementa la velocidad de reacción, y la conversión de reactivos a productos se hace menos favorable (Ratnasamy y Wagner, 2009). La generación de H_2 y CO mediante la descomposición directa de glicerol (Ecuación 2.22) fue identificada favorable a alta temperatura de operación (Slinn y col., 2008), y se supone que es la principal vía de degradación de glicerol a temperaturas mayores a 650°C (Wang y col., 2010).

Sin embargo, el mecanismo real involucra otras reacciones, de las cuales algunas ocurren de manera simultánea con el proceso de reformado, llevando a la generación de diferentes productos y subproductos, o bien contribuyendo a la deposición de depósito carbonoso sobre el catalizador, provocando desactivación y disminuyendo su actividad y estabilidad en el tiempo de reacción. Otras reacciones que ocurren durante el reformado en fase gas del glicerol son:

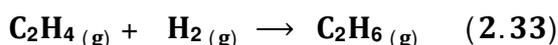
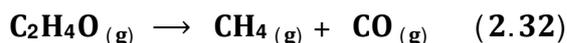
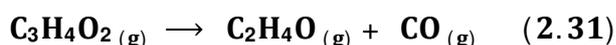
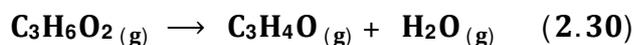
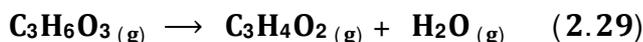
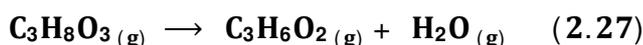
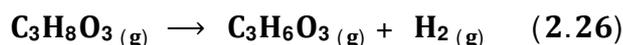


Las reacciones 2.23 y 2.24 involucran la metanación de CO y CO_2 , respectivamente, que son favorecidas a baja temperatura, mientras que ambas reacciones inversas (reformado con vapor del CH_4) ocurren preferentemente a alta temperatura. La reacción 2.25 corresponde a la conversión de CO_2 y CH_4 en H_2 y CO , favorecida a alta temperatura, mientras que la reacción inversa (hidrogenación de CO) ocurre a baja temperatura. La reacción 2.24 es la combinación entre la

reacción 2.23 y la inversa de la 2.12, mientras que la 2.25 corresponde a la combinación entre las inversas de las reacciones 2.23 y 2.12.

La formación de los gases CO e H₂ (proceso endotérmico) se favorece a altas temperaturas, mientras que la formación de CH₄ (proceso exotérmico) se favorece a bajas temperaturas. La producción de H₂ se incrementa cuando aumenta la relación molar agua:glicerol y la temperatura, y al disminuir la presión del sistema, minimizando la formación de CH₄ y de depósito carbonoso (Adhikari y col., 2007a). La formación de CH₄ durante el reformado es indeseable, pues baja el rendimiento de H₂, y el catalizador debe poseer una capacidad suficiente para reformar el CH₄ obtenido durante el proceso para la generación de H₂ (Dou y col., 2009).

Otras reacciones que ocurren en el proceso real, involucra mecanismos que generan compuestos en la fracción acuosa, y que a su vez pueden ser formados e inmediatamente transformados hacia otros subproductos. Algunas reacciones pueden ocurrir de manera simultánea, y son descriptas a continuación:



El glicerol puede deshidrogenarse a gliceraldehído (C₃H₆O₃) (Ecuación 2.26) y deshidratarse a hidroxiacetona (C₃H₆O₂) (Ecuación 2.27). Una deshidratación secundaria da lugar a 2-oxopropanal (C₃H₄O₂) y acroleína (C₃H₄O) (Ecuaciones 2.29 y 2.30, respectivamente) (Rennard y col., 2009). Por otra parte, el glicerol puede también descomponerse a etileno (C₂H₄) (Ecuación 2.28) y el 2-oxopropanal (C₃H₄O₂) puede convertirse en acetaldehído (C₂H₄O) (Ecuación 2.31), el cual finalmente puede transformarse en CH₄ y CO (Ecuación 2.32). Además, C₃H₆O₃, C₃H₆O₂ y C₃H₄O pueden descomponerse a H₂, CO, CH₄ y H₂O. La hidrogenación del etileno (C₂H₄) a etano (C₂H₆) (ecuación 2.33) también se produce en el proceso de reformado en fase gas, aunque consume parte del H₂ formado, el cual es uno de los productos de interés (Li y col., 2010b).

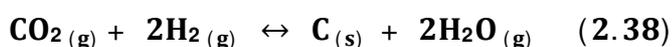
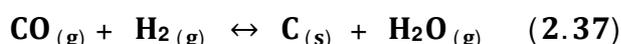
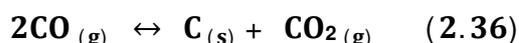
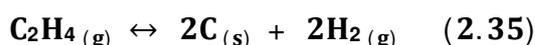
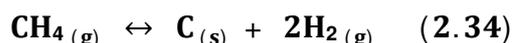
2.8.9.2.2 Depósitos de carbón

Durante el proceso de reformado en fase gas para generar H_2 , el catalizador está sometido a condiciones de operación caracterizadas por temperaturas y presiones parciales de vapor de agua elevadas, por lo que la estabilidad del material es un aspecto muy importante a considerar. Bajo estas condiciones, existen diferentes mecanismos de desactivación que tienen como consecuencia la pérdida de área superficial activa, generando problemas como la sinterización (coalescencia de las partículas metálicas activas y agregación del soporte, que genera el deterioro estructural del catalizador, generalmente al operar el reactor a altas temperaturas y cuando hay presencia de vapor de agua) (Fonseca y Assaf, 2005), envenenamiento de centros metálicos activos (quimisorción fuerte, reversible o irreversible, de reactivos, productos o impurezas presentes en alimentación del reactor) (Sánchez, 2011), ensuciamiento (deposición de carbón sobre la superficie bloqueando los sitios activos) (Bartholomew, 2001), oxidación del metal activo (por presencia de vapor de agua a alta temperatura), reacción entre metal y soporte (formando compuestos difícilmente reducibles), sublimación (pérdida de agentes metálicos dispersos en soporte debido a puntos calientes a lo largo del catalizador), o envejecimiento (largos períodos de uso del catalizador, por cambios graduales en la estructura cristalina o pérdidas del material catalítico) (Bartholomew, 2001).

Los principales tipos de depósitos carbonosos clasificados según su estructura pueden ser: filamentosos (conocido también como whisker, formado a temperaturas inferiores a $500^\circ C$), polimérico (generado por polimerización a temperaturas entre 500 y $600^\circ C$), y pirolítico (formado por craqueo de hidrocarburos a temperaturas superiores a $600^\circ C$) (Bartholomew, 2001; Fonseca y Assaf, 2005). El carbón filamentosos se forma por la difusión de carbón en la partícula metálica a bajas relaciones H_2O /reactivo y baja actividad del catalizador, dando menor desactivación que el carbón generado mediante procesos de craqueo. El carbón polimérico es generado por la reacción del compuesto alimentado adsorbido sobre la partícula metálica, formando una cápsula que envuelve los centros activos (Borowieki, 1987), siendo observado en el reformado en fase gas a baja temperatura. La formación de carbón pirolítico ocurre en condiciones de alta temperatura, donde se produce el craqueo del compuesto alimentado en la fase gas, dando lugar a la producción de olefinas y otras especies de carbón, que condensan y se degradan sobre la superficie del catalizador (Sánchez, 2011). Según varios autores, las diferencias

entre estructuras del carbón generado son debidas a diferencias en la estructura y tipo de catalizador empleado, así como por el tipo de hidrocarburo o compuesto alimentado (Borowieki, 1987). La termodinámica de la formación de carbón es independiente de la composición del catalizador, presencia de promotores y tipo de soporte, mientras que la cinética está fuertemente influenciada por estos factores.

En general, la formación de depósito carbonoso durante el reformado en fase gas del glicerol está principalmente caracterizada por las reacciones:



El carbón depositado puede formarse a partir de la descomposición del CH_4 (Ecuación 2.34) y del C_2H_4 (Ecuación 2.35), favorecidas por la utilización de una alta temperatura de operación. Otro mecanismo de relevancia es la reacción de Boudouart (Ecuación 2.36), la cual se estima que es la principal reacción productora de carbón durante el reformado en fase gas, pero esto ocurre eliminando el CO formado para transformarlo en CO_2 . Este es un proceso exotérmico, favorecido a temperaturas inferiores a 700°C (Dou y col., 2009). La formación de carbón también puede originarse debido a las reacciones de hidrogenación de los óxidos de carbono CO y CO_2 (Ecuaciones 2.37 y 2.38) y a la combinación de CO y CO_2 con CH_4 (Ecuaciones 2.39 y 2.40), las cuales ocurren a baja temperatura (Adhikari y col., 2007b). Sin embargo, en estos procesos una mayor temperatura favorece la reacción inversa, y debido a que se utiliza vapor de agua como reactante, la formación de carbón puede hacerse aún menor aumentando la concentración de agua en la mezcla alimentada al reactor. En general, a mayor temperatura de operación se produce un carbón de mayor cristalinidad. La deposición de carbón producida por la ecuación 2.34 es irreversible, mientras que la formación mediante las ecuaciones 2.35 a 2.40 es reversible, lo cual indica que los depósitos pueden ser eliminados de la superficie del catalizador mediante gasificación con vapor de agua (Sánchez, 2011).

2.8.9.2.3 Soportes y metales

Diversos trabajos se basan en el desarrollo de diferentes catalizadores, variando el tipo de soporte utilizado y el metal impregnado, para lograr una mayor eficiencia de reacción (minimizando las reacciones laterales indeseables) y la optimización de los parámetros de operación. Normalmente, son empleados como soportes diversos tipos de óxidos metálicos, que presentan moderada o elevada área superficial específica, así como diferentes carbones activados, soportes comerciales y catalizadores mixtos, además de numerosas zeolitas de diversos tamaños de canales; sin embargo estas últimas suelen presentar problemas relacionados a una fuerte desactivación o colapso estructural parcial o total cuando son sometidas a las altas temperaturas de reacción, por lo que no son comúnmente utilizadas para el proceso de reformado en fase gas (Wen y col., 2008). Los principales soportes utilizados para el proceso corresponden a óxidos tales como Al_2O_3 , MgO , SiO_2 , La_2O_3 , CeO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , V_2O_5 , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , WO_3 , MnO_2 , SiO_2 , SnO_2 , ZnO , ZrO_2 , Fe_2O_3 , Y_2O_3 , óxidos mixtos, óxidos tipo espinela, óxidos con estructura fluorita y perovskitas (Sánchez, 2011).

Debe tenerse en cuenta que las condiciones de operación a las que son expuestos los catalizadores durante el reformado en fase gas del glicerol son bastante severas, con elevada temperatura y presión parcial de vapor de agua. Por lo tanto, las propiedades físicas del catalizador son muy importantes, y la formulación de un catalizador debe dar lugar a un producto con elevada actividad y resistencia física. Por ello, otro factor a tener en cuenta es que el metal seleccionado mantenga su estado de oxidación en presencia del vapor de agua a temperaturas elevadas (500-900 °C). La actividad de algunos metales en el reformado de glicerol en fase gas fue $\text{Ru} \approx \text{Rh} > \text{Ni} > \text{Ir} > \text{Co} > \text{Pt} > \text{Pd} > \text{Fe}$ (orden decreciente) (Hirai y col., 2005). Los metales del grupo VIII B, además de presentar mayor actividad para el proceso, son también los elementos más resistentes frente a la oxidación. Por ello, si bien pueden emplearse diferentes metales (Ir, Cu, Cr, Au, Ag, Sn u otros), los más activos son los elementos que pertenecen al grupo VIII B del sistema periódico de elementos (Ni, Co, Fe, Pt, Pd, Ru y Rh) (Hirai y col., 2005).

La utilización de catalizadores con metales del grupo VIII B soportados sobre Y_2O_3 , ZrO_2 , CeO_2 , La_2O_3 , SiO_2 , MgO y Al_2O_3 demostró pequeñas diferencias en la selectividad de productos gaseosos y gran selectividad a CO_2 durante el reformado en fase gas del glicerol. Los materiales $\text{Ru}/\text{Y}_2\text{O}_3$ y Ru/ZrO_2 alcanzaron conversión

total de glicerol y rendimiento a H₂ del 90% a 600°C, alcanzando el primero mayor actividad, la cual aumentó con la carga de metal (Hirai y col., 2005). Empleando Ir, Ni o Co sobre CeO₂ a 400°C y relación molar carrier:agua:glicerol (RMCAG) de 40:9:1% v/v, Ir/CeO₂ exhibió la mayor selectividad a H₂ (58%) y conversión total de glicerol, mientras que la conversión total con Co/CeO₂ y Ni/CeO₂ se alcanzó a 425 y 450°C, respectivamente (Zhang y col., 2007). Ni/CeO₂ presentó la mejor actividad y performance catalítica en comparación con Ni/MgO y Ni/TiO₂ (Adhikari y col, 2008a); Ni/CeO₂ a 600°C, relación molar agua:glicerol (RMAG) 12:1 y flujo de alimentación de glicerol (FAG) 0,5 ml min⁻¹, alcanzó una selectividad máxima a H₂ de 74,7%, siendo 38,6% con Ni/MgO y 28,3% con Ni/TiO₂ en las mismas condiciones (Adhikari y col, 2007a). Además, el mayor rendimiento a H₂ fue de 4 moles de los 7 correspondientes al máximo estequiométrico (Adhikari y col, 2008b). La presencia de Pt sobre Al₂O₃ alcanzó 70% de selectividad a H₂ y conversión total de glicerol a gas, alcanzando la mejor performance a 880°C y FAG de 0,12 mol glicerol min⁻¹ kg catalizador⁻¹, con adecuada estabilidad del material, mostrando además que el reformado en fase gas del glicerol es el mecanismo dominante a temperaturas superiores a 700°C y FAG de 0,6 mol glicerol min⁻¹ kg catalizador⁻¹ (Slinn y col., 2008). Al emplear catalizadores con 5% p/p Rh y 30% p/p Ni sobre Al₂O₃, el mejor comportamiento fue alcanzado con Rh/Al₂O₃, siendo más activo y estable en el tiempo de reacción, posiblemente debido a una mejor distribución metálica cuando la carga fue baja, estableciendo también que el glicerol está sujeto a pirólisis y descompone drásticamente a temperatura superior a 800°C, llevando a la formación de CO, CO₂, olefinas, H₂, acetona, acetaldehído, etanol, propanol, ácido acético y 2,3-dihidroxiopropanal (Chiodo y col., 2010).

La alúmina es considerada un adecuado soporte debido a su gran área superficial que permite una adecuada dispersión metálica, manteniendo su estructura con una muy buena resistencia química y mecánica; sin embargo, presenta como desventaja la tendencia a promover la formación de coque (Alberton y col., 2007), dado que posee un carácter levemente ácido que ataca el enlace C-C de las moléculas orgánicas, junto con la posibilidad de promover la sinterización a altas temperaturas (Iriando y col., 2009). Aunque la α -Al₂O₃ proporciona una mejor resistencia mecánica, la γ -Al₂O₃ es más factible de utilizar debido a su adecuada área superficial y a que permite una mayor dispersión del metal impregnado (Alberton y col., 2007). Por su parte, el uso del Ni como elemento metálico se basa en que los catalizadores que lo contienen presentan adecuada actividad durante la

producción de H_2 por reformado en fase gas, presentando elevada actividad en la escisión de los enlaces C-C, C-H y O-H, además de promover la formación de H_2 molecular a partir de átomos simples de H (Ni y col., 2007). La principal desventaja en el uso del Ni es la tendencia hacia la formación de depósitos carbonosos como consecuencia de la deshidratación, y la sinterización durante la reacción de reformado, lo que puede conducir a una disminución significativa en la producción de H_2 durante procesos prolongados (Silvey, 2011). Sin embargo, si se tiene en cuenta tanto la actividad como estabilidad del catalizador, resulta evidente que Ni y $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ son materiales ampliamente disponibles para escala industrial, y a la vez resultan económicamente muy accesibles, en contraparte a otros soportes y metales que presentan costos considerablemente superiores.

2.8.9.2.4 Agregado de promotores

Una mejora significativa en los catalizadores se logra con la adición de un segundo elemento metálico, que funciona como promotor de ciertas funciones, permitiendo mejorar algunas desventajas que presentan los monometálicos. Estos elementos son agregados con el objeto de mejorar las características catalíticas, tales como actividad y estabilidad del material, generando mayor resistencia frente a los mecanismos de desactivación (Baker y Metcalfe, 1995). El interés en modificar el catalizador reside en la necesidad de adquirir mayor resistencia a la sinterización y deposición de coque, aumentar sus propiedades conductoras de iones óxido para intervenir de forma positiva en el mecanismo de reacción, y mantener el metal disperso y en el estado de oxidación adecuado (Sánchez, 2011).

Existen trabajos en los que la adición de elementos tales como metales alcalinos (Na, K), alcalinos-térreos (Ca, Mg), tierras raras (La, Ce, Pr) y metales de transición (Ti, V, Cr, Mn, Co, Cu, Y, Zr, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, W, Ir, Pt, Au) producen un efecto positivo sobre la actividad y estabilidad del Ni, disminuyendo el sinterizado del metal y la deposición de coque sobre la superficie catalítica, o bien aumentando la dispersión del metal (mediante una fuerte interacción metal-soporte) dando como resultado un íntimo contacto entre los gases reactantes y el metal/soporte que componen el catalizador (Sánchez, 2011). Utilizando materiales con Ni y metales nobles (Pd, Pt, Rh) soportados, el mejor comportamiento fue 65% del máximo rendimiento teórico de H_2 para una alimentación 38% glicerol y 62% agua a 800°C, aumentando el rendimiento a 75% al agregar un reactor de WGS

operado a 370°C (Douette y col., 2007). Catalizadores monometálicos de Ni y Pt y bimetalicos Ni-Pt soportados sobre Al_2O_3 mejoraron su comportamiento al agregar 3, 6 y 15% p/p de La_2O_3 , alcanzando Ni/ Al_2O_3 con 6% p/p La_2O_3 la mayor relación molar de H_2 ; los demás catalizadores de Ni generaron importante formación de CH_4 igual que los bimetalicos, mientras que los de Pt presentaron elevada producción de hidrocarburos oxigenados (Irrondo y col., 2009). Un material con Pd, Ni, Cu y K sobre Al_2O_3 , evaluado en el rango 550-850°C, generó 50-60% de rendimiento a H_2 , con mejores resultados a mayor temperatura y obteniendo CO_2 , CO y CH_4 en bajas concentraciones (Swami y Abraham, 2006). Con 10 p/p Ni sobre $\text{MgO-Al}_2\text{O}_3$, una adecuada temperatura de calcinación generó una favorable interacción entre la fase metálica y el soporte, aumentando la actividad catalítica (Dieuzeide y col., 2012).

El grupo de los metales de transición representa un gran atractivo para agregarse como elemento promotor, debido a que logran mejorar notablemente la actividad catalítica, junto con una mayor resistencia a la deposición de carbón. Sin embargo, los metales nobles no son un objetivo viable debido a su menor disponibilidad a gran escala y por poseer costos significativamente superiores (Foo y col., 2012). Fuera del grupo de los metales nobles, el Co aparece como elemento posible para ser promotor, aunque su costo sea superior al del Ni. Existen pocos estudios reportados en los cuales se utilicen catalizadores de Co/ Al_2O_3 para la producción de hidrógeno mediante la reacción de reformado en fase gas. Un catalizador de Co soportado en Al_2O_3 presentó adecuada actividad en el reformado en fase gas, alcanzando 70% de conversión de glicerol y una producción de GS en valores de relación H_2/CO entre 6 a 12, dependiendo de la composición de la solución de glicerol alimentada (30 a 60% p/p), junto con la generación de bajas cantidades de CH_4 (Cheng y col., 2010a). Empleando ácido acético como material de partida, y evaluando el comportamiento entre 350-450°C y velocidad espacial líquida horaria (VELH) $10,1 \text{ h}^{-1}$, el aumento de temperatura mejora notablemente la actividad del catalizador Co/ Al_2O_3 , mientras que el agregado de Ce o La suprimió la formación de productos indeseables como acetona y cetena, favoreciendo la producción de H_2 (Hu y Lu, 2010). El desempeño catalítico de Co-Ni/ Al_2O_3 a 600°C mostró que H_2 y CO_2 fueron los productos generados en mayor cantidad (relación H_2/CO_2 entre 2,1-2,3), con baja proporción de CH_4 ; mientras que la relación H_2/CO fue elevada (>10), lo que indicó que en exceso de vapor el producto CO fue principalmente convertido en CO_2 e H_2 por la reacción WGS (Cheng y col., 2010b). Catalizadores bimetalicos Co-Ni/ Al_2O_3 para producir H_2 se evaluaron con diferentes

materias primas y procesos: reformado en fase gas de acetol (Ramos y col., 2007), reformado en fase líquida de glicerol (Luo y col., 2010), reformado autotérmico de etanol (Youn y col., 2006), y reformado seco de CH_4 (Foo y col., 2012).

El uso de promotores del grupo de los lantánidos también ha mostrado gran atractivo, relacionado a la disminución de la cantidad de carbón en los materiales dados sus múltiples y estables estados de oxidación (Urasaki y col., 2005). La adición de Ce como elemento promotor se fundamentó en que el óxido de cerio (CeO_2), con su estructura tipo fluorita, mejora la actividad del material sin pérdida de superficie del soporte Al_2O_3 y evita la sinterización de especies metálicas (Srisiriwat y col., 2009). Estas propiedades beneficiosas están asociadas a que el CeO_2 , además de presentar un carácter básico, tiene la capacidad de almacenar, liberar y transportar oxígeno a través de su red estructural, y al mismo tiempo adsorber vapor (Iriando y col., 2010). El CeO_2 produce un material más activo durante la reacción debido a que permite mayor movilidad de O_2 , aumenta la estabilidad del soporte y la dispersión de partículas metálicas, favorece la reversibilidad redox de la fase metálica, así como promueve la oxidación del carbón depositado mediante gasificación (Lin y col., 2012; Alberton y col., 2007).

Numerosos estudios reportan el uso de catalizadores $\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (Iriando y col., 2010; Iriando y col., 2012; Lin y col., 2012; Chang y col., 2012; Kamonsuangkasem y col., 2013) aunque pocos trabajan con baja carga de Ce. Catalizadores de $\text{Ni}/\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ con bajas cantidades de CeO_2 favorecen la conversión de los compuestos oxigenados intermediarios hacia productos gaseosos finales (Iriando y col., 2012). Impregnando Rh, Pt, Pd, Ir, Ru y Ni sobre Al_2O_3 y sobre un soporte mixto Al_2O_3 (92%)- SiO_2 (8%), $\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $\text{Rh}/\text{CeO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ presentaron mejores comportamientos a 900°C , RMAG 9:1 y FAG $0,15 \text{ ml min}^{-1}$, alcanzando selectividades a H_2 de 80 y 71%, respectivamente; para ambos catalizadores, el aumento de la carga metálica de 2,5 a 3,5% p/p eleva la conversión de glicerol pero no influye significativamente sobre la selectividad a H_2 , mientras que el aumento en la RMAG incrementa la conversión de glicerol y la selectividad a H_2 (Adhikari y col., 2007c). Comparando catalizadores con 2% p/p de Ni sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ y $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ modificada con 5% p/p de ZrO_2 y CeO_2 , $\text{Ni}/\text{CeO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ presentó el mejor comportamiento a temperaturas entre 450 y 600°C , alcanzando 90% de conversión y 86% de rendimiento de H_2 ; el Ce inhibe las reacciones laterales de deshidratación que forman hidrocarburos insaturados, los cuales son precursores del depósito carbonoso que provoca la rápida desactivación (Buffoni y col., 2009). Al emplear $\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ modificado con Ce,

Mg, Zr y La a 600°C y velocidad espacial másica horaria (VEMH) de 2,5 h⁻¹, la incorporación de promotores favorece la selectividad a H₂, con una funcionalidad catalítica diferente para cada sistema: Mg mejora la dispersión/concentración de níquel superficial, Zr aumenta la capacidad de activar el vapor, y Ce y La mejoran la estabilidad de las fases Ni en las condiciones de reacción (Iriando y col., 2008). Con catalizadores La_{1-x}Ce_xNiO₃ (x = 0; 0,1; 0,3; 0,7), La_{0,3}Ce_{0,7}NiO₃ fue el material más activo con más de 98% de conversión de glicerol a 700°C y rendimiento de H₂ cercano al del equilibrio termodinámico, menor formación de depósito carbonoso y alta estabilidad durante 10 horas a 600°C (Cui y col., 2009).

Finalmente, es de gran importancia la evaluación de las diferencias entre la alimentación al sistema de reacción de glicerol puro y crudo, ya que en el glicerol crudo existen impurezas provenientes del proceso de producción del biodiésel que pueden afectar negativamente la actividad y estabilidad del catalizador en reacción. Estas impurezas pueden ser remanentes de sales y ácidos grasos de cadena larga, que reaccionan con dificultad y tienen mayor probabilidad de formar depósito carbonoso, provocando un rendimiento global menor que con glicerol puro (Slinn y col., 2008). El reformado en fase gas de glicerol puro y crudo sobre un catalizador Ni/Al₂O₃ a 800°C, mostró que el crudo inicialmente alcanzó mejores rendimientos a H₂ que el puro; sin embargo, se obtuvo un GS de mayor pureza con glicerol puro (relación H₂/CO de 1,94) (Valliyappan y col., 2008). Empleando un catalizador comercial de Ni a 850°C, la selectividad a H₂ fue ligeramente superior con glicerol crudo que con puro, siendo del 95% del máximo rendimiento teórico de H₂, mientras que la concentración de productos en fase gas fue constante, con aumento gradual en la producción de CH₄ (Czernik y col., 2002).

2.9 Procesos biológicos

La biotecnología es la integración de las ciencias naturales e ingeniería aplicadas al empleo de organismos vivos con el propósito de obtener algún producto o servicio de utilidad para el hombre (López-Munguía, 2000). Su historia inició con la fabricación de bebidas fermentadas hace más de 8000 años, tales como cerveza, pan, vino, vinagre, queso y yogurt, en diferentes partes del mundo. El descubrimiento y la fabricación de estos productos fue el comienzo de la biotecnología, aunque estas civilizaciones todavía no tenían conocimientos suficientes para comprender la forma en que ocurrían estos procesos.

Las aplicaciones descritas corresponden a los actualmente llamados procesos biotecnológicos o bioprocesos, que son el conjunto de técnicas que comprenden la producción de sustancias útiles mediante el empleo de cultivos celulares (Kansiz y col., 2001). Un bioproceso involucra la transformación de un sustrato determinado en productos mediante microorganismos, cultivos de células animales o vegetales o por materiales derivados de estos como las enzimas. Estos productos se obtienen o modifican mediante procesos que involucran cambios físicos o químicos de la materia. Los bioprocesos han experimentado un gran desarrollo, permitiendo la obtención de diversos productos, desde materiales relativamente baratos, como alcohol y disolventes orgánicos, hasta compuestos químicos más caros como antibióticos, proteínas terapéuticas y vacunas (**Figura 2.13**). Las enzimas utilizadas en la industria y las células vivas, como levaduras de pan y cerveza, son también productos comerciales provenientes de bioprocesos (Dorán, 1998).

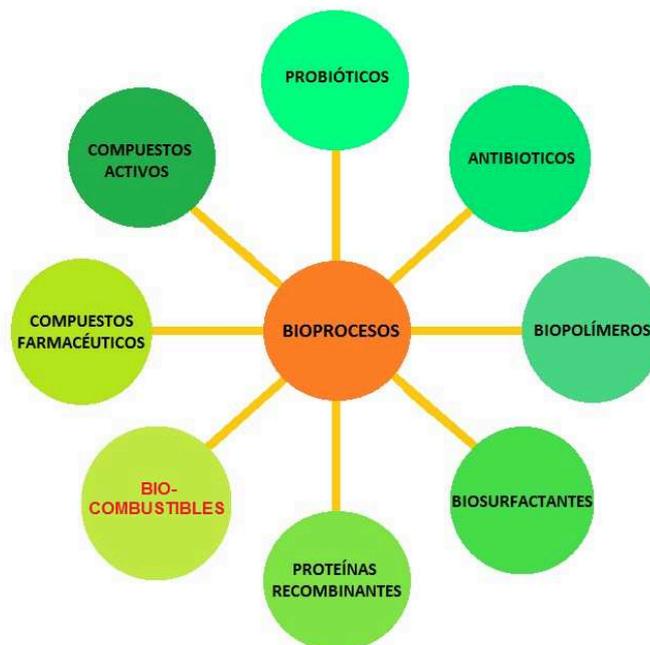


Figura 2.13: Principales bioprocesos desarrollados a escala industrial para la obtención de diferentes productos de valor agregado.

En la actualidad, existen numerosos tipos de procesos biológicos aplicados a la valorización de diferentes sustancias de desecho o a la utilidad de subproductos en exceso provenientes de otras industrias, principalmente para la transformación en compuestos con mayor valor agregado y/o mayor valor energético. Estos procesos se llevan a cabo a presión y temperatura ambiente, y por tanto requieren menor consumo energético que los procesos catalíticos o electroquímicos.

Según ha sido mencionado en los procesos catalíticos, la utilización del glicerol ha tomado gran impulso debido al importante crecimiento de la industria de producción de biodiésel, que generó un notable incremento en la disponibilidad de glicerol y una disminución en su costo como materia prima (Fan y col., 2010). La provincia de Santa Fe posee las principales plantas productoras de biodiésel del país, por lo que la valorización del subproducto generado es altamente factible siempre que exista un adecuado desarrollo en las diferentes tecnologías que permitan su utilización. Actualmente, la conversión de glicerol a H_2 presenta gran relevancia debido al papel que juega este gas en cuanto a la generación de energía y como insumo industrial, por tratarse de un vector energético sostenible y renovable que presenta bajos niveles de contaminación durante su producción o su posterior combustión (Chen, 2006). Esta afirmación puede ser justificada teniendo en cuenta la evolución de la cantidad de trabajos científicos publicados referidos a procesos que involucran microorganismos, en los cuales se utilizó glicerol como sustrato de partida, o bien en las que se analizó la transformación del glicerol para la producción de H_2 , siendo mostrados en la **Figura 2.14** durante el período comprendido entre 1996 y enero de 2015.

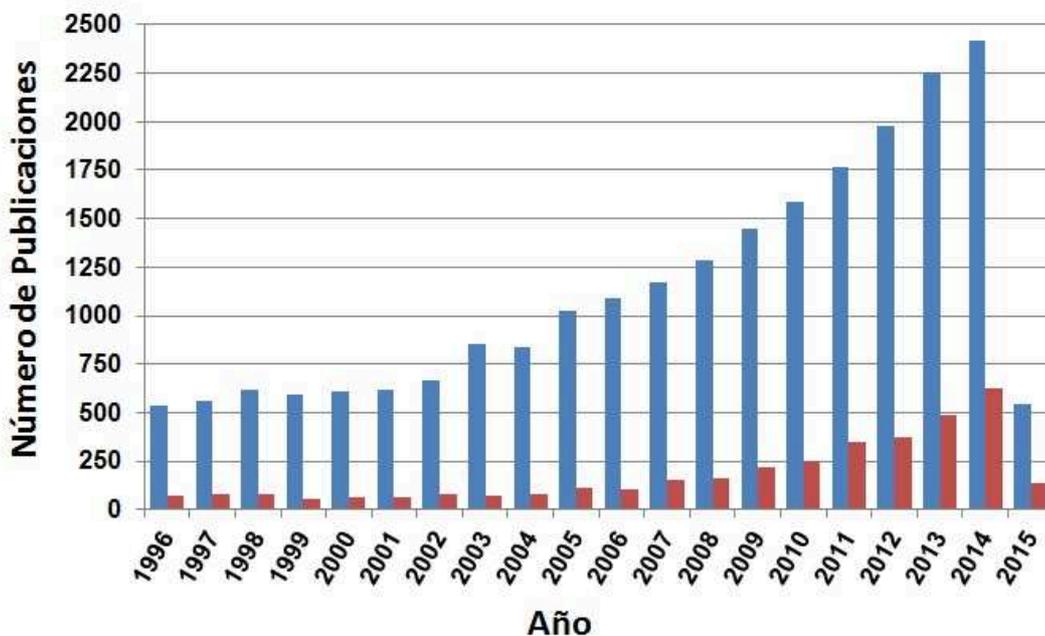


Figura 2.14: Evolución de la cantidad de trabajos científicos publicados, referidos a procesos biológicos que involucran microorganismos: para la transformación del glicerol (barras azules) y para la conversión del glicerol hacia H_2 (barras rojas), desde 1996 hasta enero de 2015. (<http://www.sciencedirect.com>; palabras clave: “Glycerol”, “Microorganism” (barras azules) y “Glycerol”, “Microorganism”, “Bio-hydrogen” (barras rojas).

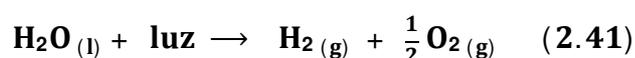
El glicerol puede ser fácilmente incluido en la formulación de un medio de cultivo, siendo un compuesto que provee carbono y energía al organismo que se cultiva (Shiloach y Fass, 2005; Nakano y col., 1997). Otros estudios demuestran que muchos microorganismos pueden utilizar naturalmente el glicerol como fuente de carbono y energía, posibilitando el desarrollo de estrategias que faciliten la bioconversión del glicerol proveniente de la industria del biodiésel (Barbirato y col., 1997; Menzel y col., 1997).

En función de las vías metabólicas utilizadas por diferentes microorganismos, los sistemas biológicos de producción de H₂ pueden clasificarse en: biofotólisis directa e indirecta del agua con algas verdes y cianobacterias; fotofermentación de materiales orgánicos por bacterias fotosintéticas; y fermentación oscura de materiales orgánicos empleando bacterias fermentativas (Hallenbeck y Benemann, 2002). También fueron descritos sistemas con bacterias que crecen en oscuridad usando CO como única fuente de carbono (Levin y col., 2004), así como un sistema híbrido desarrollado por la combinación entre la fermentación y la fotofermentación donde la bacteria no fotosintética primeramente produce H₂ y ácidos orgánicos a partir de la degradación de carbohidratos sin utilizar la luz, mientras que en la siguiente etapa los ácidos orgánicos resultantes son sustratos para la bacteria fotosintética, la cual genera más H₂ (Das y Veziroglu, 2001).

2.9.1 Biofotólisis directa

El proceso de biofotólisis consiste básicamente en la disociación del agua mediante microorganismos fotosintéticos (cianobacterias y algas verdes), los cuales capturan la energía de la luz a través de clorofilas y pigmentos fotosintéticos. Estos elementos son encargados de absorber los fotones (partículas de luz) y generar poder oxidante (gradiente de protones) que logra la descomposición del agua en protones (H⁺), electrones (e⁻) y oxígeno gas (O₂) (Hallenbeck y Benemann, 2002).

La biofotólisis directa, realizada por las algas verdes, involucra la producción de H₂ y O₂ a partir del agua y la luz solar en una única etapa, siendo representada por:

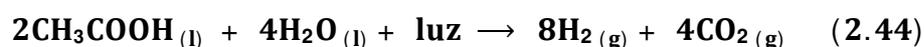
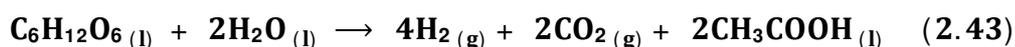


En la biofotólisis directa se eleva el nivel energético de los electrones del agua, y ocurre rápida y simultáneamente la descomposición del agua y la transferencia de electrones a la ferredoxina (Fd), generando H₂ de manera continua. Teniendo en

cuenta que la hidrogenasa en este proceso no es tolerante al O_2 y que la fotosíntesis genera H_2 y O_2 de forma simultánea, el mecanismo no es eficiente si se realiza de forma continua (Nath y Das, 2004). Para evitar tales problemas, se ha intentado mejorar la eficiencia para conseguir hidrogenasas menos sensibles al O_2 , inhibición del transporte cíclico de electrones, o estimulación de la respiración para reducir el O_2 celular libre. Durante el proceso se generan 2 moles de H_2 por mol de O_2 liberado, siendo las microalgas unicelulares las mejores productoras de H_2 por esta vía (Brentner y col., 2010). Dentro de este grupo, los principales estudios fueron realizados basados en *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhang y Melis, 2002; Levin y col., 2004). Estos organismos requieren de un tiempo de incubación anaeróbica en oscuridad para inducir la síntesis o actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del H_2 , como las hidrogenasas reversibles e irreversibles (Melis y Happet, 2001).

2.9.2 Biofotólisis indirecta

Este proceso es llevado a cabo por cianobacterias, y consiste en una etapa de fotosíntesis donde la molécula de CO_2 es fijada a sustratos que contienen H en su estructura, junto con otra etapa de generación de hidrógeno molecular cuando estos microorganismos son incubados en condiciones anaerobias (Dutta y col., 2005). El mecanismo es representado por:



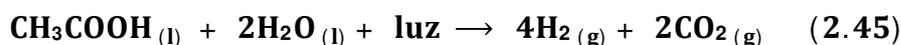
Las cianobacterias poseen varias enzimas involucradas directamente en el metabolismo del H_2 . La más importante, la nitrogenasa, cataliza la producción de H_2 en el proceso de fijación del nitrógeno. Otra enzima es la hidrogenasa captadora, la cual oxida el hidrógeno que sintetiza la nitrogenasa y, por último, están las hidrogenasas bidireccionales que tienen la habilidad de oxidar y sintetizar hidrógeno (Bedoya y col., 2008). En el proceso se requiere un sistema de cultivo inicial para la fotosíntesis y otro sistema diferente para la generación de H_2 (Kovács y col., 2006). En el segundo sistema, debe utilizarse un medio libre de nutrientes que contengan azufre para evitar la producción de O_2 por parte del fotosistema II,

ya que la ausencia de este elemento impide la formación del complejo enzimático (Laurinavichene y col., 2006; Tsygankov y col., 2006; Fouchard y col., 2008).

La producción de H₂ por cianobacterias ha revelado que la fotoconversión eficiente del agua en H₂ es influenciada por diversos factores, siendo la intensidad de luz el más importante. Las tasas de producción de H₂ son variables y dependen de las especies de cianobacterias y de las condiciones del proceso. Algunas desventajas son las bajas tasas de producción y la necesidad de remover el O₂ producido, debido a que actúa como inhibidor de las enzimas hidrogenasas y nitrogenasas (Kapdan y Kargi, 2006).

2.9.3 Fotofermentación

Durante el proceso se emplean bacterias púrpuras no sulfurosas (fotoheterótrofas) que producen H₂ catalizado por la nitrogenasa en condiciones deficientes de N₂, utilizando luz y compuestos reducidos como fuentes de carbono (ácidos orgánicos), que muchas veces se encuentran presentes en sustancias de desecho. El mecanismo general viene dado por:



Aquí interviene la hidrogenasa captadora de H₂, que compite por H₂ disponible en el medio, reduciendo la actividad de la nitrogenasa al quedar sin sustrato. Uno de los parámetros que más afectan la fotofermentación es la intensidad de luz, pues un incremento de ésta afecta de forma simultánea la velocidad de producción y rendimiento a H₂ (Reith y col., 2003; Kapdan y Kargi, 2006).

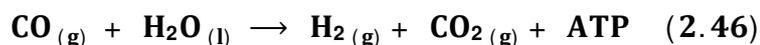
El proceso presenta ventajas relacionadas al elevado rendimiento máximo teórico, la no generación de O₂ (represor de la nitrogenasa y otros sistemas involucrados en la producción de H₂), capacidad de emplear amplio rango de longitudes de onda y facilidad en el consumo de sustratos orgánicos derivados de productos de desecho. Sin embargo, las principales desventajas aparecen en el alto consumo de ATP por parte de la nitrogenasa (la cual es inhibida por O₂, amonio y altas relaciones N/C), junto con la baja eficiencia de conversión a partir de la utilización de energía solar (Bedoya y col., 2008).

Los tipos de foto-biorreactores desarrollados para este sistema son diversos, y por ello los resultados obtenidos fueron variables respecto a producción de H₂,

debido a diferencias en la agitación e intensidad de luz, parámetros cruciales en este método de producción (Reith y col., 2003; Kapdan y Kargi, 2006). Ha sido demostrado que las tasas de producción de H₂ son superiores al emplear células inmovilizadas que cuando se utilizan células suspendidas en la fase líquida (Levin y col., 2004). La mayoría de los procesos empleados en fotofermentación han sido realizados con microorganismos del género *Rhodobacter* en cultivos tipo *batch* (algunas veces con inmovilización celular) y con menor frecuencia en sistemas tipo continuo (Kapdan y Kargi, 2006). Sin embargo, hay estudios de fotofermentación desarrollados en organismos tales como *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum* o *Rhodovulum* (Pintucci y col., 2013; Kim y col., 2008; Cai y col., 2012).

2.9.4 Reacción de intercambio gas-vapor de agua

Ciertas bacterias fotoheterotróficas, dentro de la superfamilia *Rhodospirillaceae*, pueden crecer en oscuridad usando CO como única fuente de carbono para generar ATP, con la liberación de H₂ y CO₂ (Levin y col., 2004):

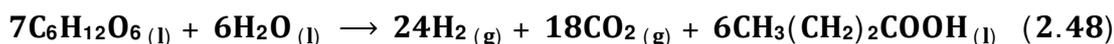
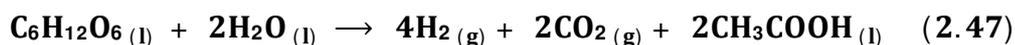


En estos microorganismos, la producción de hidrógeno es mediada por reacciones enzimáticas, las cuales se dan a temperaturas y presiones ambientales. La enzima encargada de capturar el CO y oxidarlo es la óxidoreductasa-CO-deshidrogenasa, y es parte de un complejo enzimático unido a la membrana (Levin y col., 2004). Este proceso puede ser prometedor para la remoción del CO en mezclas de gases en el cual sea un compuesto indeseable, transformándolo a H₂. Existen trabajos relacionados al diseño de biorreactores que permiten operar este proceso, sin embargo aún se deben mejorar las limitaciones de transferencia de masa relacionadas a los mismos (Bedoya y col., 2008).

2.9.5 Fermentación

La producción de H₂ mediante este proceso ocurre bacterias que crecen sin la necesidad de una fuente lumínica externa, empleando numerosos sustratos ricos en carbohidratos. Durante este proceso catabólico, las bacterias convierten los azúcares y las proteínas a ácidos carboxílicos, H₂, CO₂ y disolventes orgánicos. Esta reacción bioquímica es inhibida por la presencia de O₂ y por lo tanto solo debe

realizarse bajo estrictas condiciones anaeróbicas (Levin y col., 2004). Un compuesto de partida ampliamente utilizado es la glucosa, que presenta como principales subproductos de la fermentación al ácido acético (máximo teórico de 4 mol H₂ mol glucosa⁻¹) y butírico (máximo teórico de 3,4 mol H₂ mol glucosa⁻¹), alcanzando rendimientos prácticos de H₂ durante la fermentación de 2 mol H₂ mol glucosa⁻¹ (Levin y col., 2004), según se describe a continuación:



La fermentación puede llevarse a cabo a diferentes temperaturas, dependiendo del microorganismo con el cual se trabaja: pueden ser mesófilos (25-40°C), hasta termófilos (> 50°C) (Zhang y col., 2003; Lin y Chang, 2004). La producción de H₂ así como la formación de otros productos obedece a las condiciones ambientales en las cuales los microorganismos crecen, como la temperatura, pH, agitación y presión parcial del gas. Productos como etanol, butanol y lactato contienen hidrógeno que todavía no ha sido liberado; así, para maximizar la cantidad de H₂, el metabolismo de la bacteria debe direccionarse hacia la producción de compuestos con bajo contenido de este elemento (Lee y col., 2006; Lin y Chen, 2006).

El análisis de las rutas metabólicas implicadas demostró que el glicerol resultaría más promisorio que la glucosa (sustrato universal) para la producción fermentativa de H₂, con un rendimiento de 3 moles de H₂ por mol de glicerol consumido (Selembo y col., 2009). La producción de biohidrógeno mediante fermentación se puede llevar a cabo tanto con cultivos poliaxénicos, los cuales suelen provenir de productos de desecho, como con cultivos axénicos, donde son utilizadas diferentes especies de bacterias correspondientes a géneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia*, entre otras (Reith y col., 2003).

2.9.5.1 Cultivos poliaxénicos

Las principales fuentes de obtención de cultivos poliaxénicos corresponden a compost, suelos, lodos municipales, efluentes líquidos y cualquier otro desecho que contenga organismos vivos. Esta microbiota contiene bacterias metanogénicas no deseadas para la producción de H₂, que generalmente lo consumen para generar CH₄ (Bedoya y col., 2008). Generalmente se utilizan pretratamientos con calor y/o pH extremos para enriquecer la microbiota productora de H₂ e inhibir la actividad de

los organismos que lo consumen. El uso de un cultivo microbiano poliaxénico para la conversión de un determinado sustrato (por ejemplo glicerol crudo) generalmente presenta una mayor eficiencia debido a los efectos sinérgicos beneficiosos de los organismos. Además, la capacidad de degradación del consorcio microbiano no es necesariamente el resultado de la simple adición de las características funcionales y las capacidades de las cepas individuales (Ghazali y col., 2004). Una importante ventaja respecto al uso industrial de cultivos poliaxénicos en relación a cultivos axénicos, es que éstos son menos sensibles a la contaminación por bacterias metanogénicas (Bedoya y col., 2008). Sin embargo, la principal desventaja está relacionada a la dificultad de controlar los procesos en los cuales se emplean estos cultivos (debido a la falta de conocimiento de los organismos involucrados), lo cual impide obtener rendimientos reproducibles. Otras dificultades son la imposibilidad de comparar los resultados obtenidos, debido a que los medios poliaxénicos utilizados en diferentes investigaciones difícilmente sean iguales (Qatibi y col., 1991). Además, el comportamiento de los microorganismos puede diferir levemente entre ensayos, en función de la cantidad de productos generados por cada especie y/o las interacciones entre las distintas poblaciones microbianas.

Los cultivos poliaxénicos han sido investigados para la producción de H_2 a partir de glicerol. Los rendimientos máximos de H_2 obtenidos fueron entre 0,80 a 0,96 mol H_2 mol sustrato⁻¹ (Varrone y col., 2012), mientras que la productividad a H_2 presentó valores entre 30-50 mmol H_2 L⁻¹ h⁻¹ (Reith y col., 2003). La producción de H_2 a partir de glicerol puro, empleando un lodo activado municipal, mostró un rendimiento máximo de 0,41 mol H_2 mol glicerol⁻¹, degradando 10 g L⁻¹ de sustrato (Seifert y col., 2009). Otro estudio demostró que 20 g L⁻¹ de glicerol crudo derivado de la industria del biodiésel fue completamente degradado empleando un lodo con actividad aumentada, con un rendimiento máximo de 0,73 mol H_2 mol glicerol⁻¹ (Varrone y col., 2012). Otros autores compararon diferentes métodos de pretratamiento sobre el cultivo microbiano poliaxénico, y demostraron que el pretratamiento por choque térmico produjo mayor rendimiento a H_2 (5,27 mol% H_2 g glicerol⁻¹) y eficiencia en la degradación del sustrato (65,7%) en comparación con el control no tratado por calor (1,2 mol% H_2 g glicerol⁻¹ y eficiencia en la degradación del sustrato 48%) (Misturini Rossi y col., 2011). Los cultivos poliaxénicos de organismos termófilos también fueron analizados para producir H_2 , obteniendo rendimientos menores (0,30 mol H_2 mol glicerol⁻¹) que con organismos mesófilos,

aunque presentaron un control más eficaz sobre los patógenos y menor riesgo de contaminación por bacterias metanogénicas (Sittijunda y Reungsang, 2012).

Ha sido reportado la utilización de cultivos poliaxénicos provenientes de lodos activados, lodos digeridos anaeróbicamente, compost de desechos, suelos de cultivos agrícolas y sedimentos de lagos, mostrando rendimientos cercanos a 2 moles H_2 mol glucosa⁻¹, y demostrando en muchos casos la presencia dominante de cepas del género *Clostridium* en los cultivos acondicionados (Lin y Chang, 2004). La transformación del glicerol por cultivos poliaxénicos demostró la formación de etanol y formiato a bajas concentraciones de sustrato, mientras que se genera 1,3-PDOL y acetato con concentraciones crecientes de sustrato. Respecto a glucosa, se produce etanol, acetato y butirato a bajas concentraciones, mientras que acetato y etanol fueron los productos mayoritarios con mayor concentración de sustrato (Temudo y col., 2008). Al utilizar un cultivo poliaxénico con glicerol como sustrato, la recuperación de carbono a partir de glicerol fue superior en presencia de sulfato, lo cual permitió identificar la presencia mayoritaria de *Desulfovibrio* sp. en este cultivo, junto con ciertas especies de los géneros *Propionobacterium* y *Metzanibacterium* (Qatibi y col., 1991). Fue observado que las velocidades de degradación de sustrato de un cultivo poliaxénico previamente tratados con calor seco y desecación seguido por choque térmico fueron mayores que las encontradas con los cultivos control durante la fermentación del glicerol. Las producciones máximas de H_2 y biomasa obtenidas fueron 34,19 mol% y 4340 mg L⁻¹, respectivamente; los principales microorganismos identificados en el consorcio pertenecen a los géneros *Klebsiella* y *Pantoea* (Misturini Rossi y col., 2011). La utilización de un consorcio microbiano en la conversión fermentativa de glicerol a 30°C y pH 7 luego de 72 h de cultivo, generó una concentración máxima, productividad y rendimiento a etanol de 6,5 g L⁻¹, 0,34 g L⁻¹ h⁻¹ y 0,85 mol etanol mol glicerol⁻¹, respectivamente; los organismos mayoritarios presentes en este consorcio fueron bacterias estrechamente relacionadas a los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella*, encargadas de desempeñar la conversión de glicerol a etanol en este sistema (Vikromvarasiri y col., 2014).

2.9.5.2 Cultivos axénicos

2.9.5.2.1 Microorganismos de ambientes salinos

Los microorganismos que habitan en ambientes con concentraciones salinas en exceso (hipersalinos) presentan diferentes mecanismos que le permiten combatir el estrés osmótico gracias a la acumulación citoplasmática de solutos compatibles y compuestos de bajo peso molecular como glicerol, ectoína o sacarosa, entre otros, permitiendo la estabilidad celular y la protección de toda la maquinaria enzimática, los ácidos nucleicos y las membranas celulares ante las condiciones desfavorables que presenta el medio ambiente circundante (Roberts, 2005). Fue sugerido que la presencia de ciertos compuestos, como betaína, glicerol, prolina o trehalosa, entre otros, favorece la activación de proteínas chaperonas, las cuales facilitan la estabilización y plegamiento de numerosas proteínas intracelulares (Roberts, 2005).

Los microorganismos *Haloicola saccharolytica* y *Halanaerobium lacusrosei*, aislados de sedimentos de lagos hipersalinos alrededor del mundo, son capaces de generar H₂ a partir de la fermentación del glicerol. Fue observado que *H. saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* produce la oxidación anaerobia de determinados solutos compatibles, tales como glicerol, para realizar la transferencia de electrones desde este compuesto hacia diversos aceptores biológicos, como son los reductores de sulfato (Zhilina y col., 1992). Los hidratos de carbono y moléculas simples sirven como fuentes de energía, y en un medio de cultivo óptimo de 10% p/v de NaCl los productos finales de la fermentación fueron acetato, H₂ y CO₂ (Zhilina y col., 1992). *H. saccharolyticum* subsp. *senegalense* fue capaz de fermentar mayor cantidad de sustratos, como celobiosa, fructosa, glucosa, maltosa, lactosa, manosa, ribosa, rafinosa, sacarosa, glicerol y manitol, generando productos finales como acetato, H₂ y CO₂, y sin detectar la formación de etanol. El H₂ no fue utilizado como donador de electrones para reducir el CO₂ a acetato, y el crecimiento celular fue óptimo entre 7,5-12,5% p/v de NaCl (Cayol y col., 1994). En otro estudio, *H. saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* produjo 1,3-PDOL, butirato y etanol. Los mayores rendimientos a H₂ fueron obtenidos con 2,5 g L⁻¹ de glicerol y 150 g L⁻¹ de sal a pH 7,4 con *H. saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* (0,6 mol H₂ mol glicerol⁻¹) y a pH 7,0 con *H. saccharolyticum* subsp. *senegalense* (1,6 mol H₂ mol glicerol⁻¹), siendo este último muy promisorio para aplicaciones prácticas de escalado y optimización de bioprocesos, junto con ingeniería metabólica luego de la

secuenciación de su genoma (Kivistö y col., 2010). Otra especie estrechamente relacionada a las anteriores fue *H. lacusrosei*, capaz de fermentar glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, lactosa, maltosa, celobiosa, sacarosa, almidón, manitol y glicerol, generando etanol, acetato, H₂ y CO₂ como principales compuestos finales. Fue capaz de crecer a concentraciones salinas superiores a las cepas anteriores (entre 180 a 200 g L⁻¹ NaCl), aunque requiere de extracto de levadura (EL) en el medio de cultivo para poder mantener el crecimiento celular (Cayol y col., 1995).

2.9.5.2.2 Microorganismos del género *Clostridium*

Los microorganismos del género *Clostridium*, los cuales son anaerobios estrictos y por ende muy sensibles a la presencia de O₂, han sido uno de los grupos más estudiados en la fermentación de diferentes sustratos, preferentemente en cultivos de tipo *batch* y en menor medida en sistemas *semi-batch* o continuo. Preferentemente ha sido estudiado empleando glucosa, sin embargo se ha visto que existen especies capaces de utilizar otros carbohidratos simples como xilosa, arabinosa, galactosa, celobiosa, sacarosa y fructosa, lo que sugiere que se pueden utilizar sustratos más complejos como almidón, celulosa y hemicelulosa. Este género produce una mezcla de productos entre ácidos, alcoholes, H₂ y CO₂, con un rendimiento general de 2 moles H₂ mol glucosa⁻¹ (Bedoya y col., 2008).

Numerosas especies de *Clostridium* han sido empleadas para la producción industrial de disolventes (butanol y acetona) o ácidos (butírico y acético), procesos en los que se genera H₂ como subproducto (Zverlov y col., 2005). La capacidad de fermentación del glicerol por especies *Clostridium* ha sido ampliamente estudiada con objeto de mejorar principalmente la producción a 1,3-PDOL. La fermentación con *C. butyricum* en un reactor tipo *batch* alimentado alcanzó una productividad a 1,3-PDOL de 3,3 g L⁻¹ h⁻¹ partiendo de 93,7 g L⁻¹ de glicerol puro, mientras que fue de 2,3 g L⁻¹ h⁻¹ al utilizar 76,2 g L⁻¹ de glicerol proveniente del biodiésel (Wilkens y col., 2012). El butanol también fue producido mediante fermentación del glicerol por *Clostridium*, compuesto que posteriormente puede ser empleado como disolvente, biocombustible o aditivo de naftas (Khanna y col., 2011).

Especies como *C. butyricum* y *C. pasteurianum* fueron analizadas en cuanto a su capacidad de producción de H₂ a partir del glicerol. *C. pasteurianum* demostró que al emplear glicerol puro (10 g L⁻¹), la productividad y rendimiento a H₂ fueron 103,1 ± 8,1 mL L⁻¹ h⁻¹ y 0,50 ± 0,02 mol H₂ mol glicerol⁻¹, respectivamente. Al utilizar

glicerol crudo, estos valores mejoraron a $166,0 \pm 8,7 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,77 \pm 0,05 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$, respectivamente. Los valores obtenidos con *C. pasteurianum* fueron superiores que los obtenidos para *C. butyricum* (Lo y col., 2013). Utilizando un cultivo poliaxénico de *Clostridium* spp., el empleo de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol crudo generó $1,1 \pm 0,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$, evidenciando ausencia de efectos inhibitorios por parte de las impurezas del glicerol crudo respecto de la comparación con el glicerol puro (Mangayil y col., 2012). Otras especies, como *C. tyrobutyricum*, *C. thermolacticum*, *C. paraputrificum* y *C. bifementants* también han sido evaluadas en cuanto a su capacidad de producción de H_2 a partir de sustratos simples (hexosa, lactosa y glucosa). Por tratarse de un sustrato sencillo y que sirve como fuente de carbono, el glicerol posee potencial para ser metabolizado por estos microorganismos.

2.9.5.2.3 Microorganismos de la familia Enterobacteriaceae

2.9.5.2.3.1 Los géneros Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* fueron extensivamente estudiados en relación a la producción de H_2 desde glicerol, mientras que *Citrobacter* fue analizado con menor frecuencia.

Las especies *Citrobacter* son conocidos por su capacidad para producir 1,3-PDOL a partir de la fermentación del glicerol, con valores comparables a los producidos por ciertas especies de *Klebsiella* y *Clostridium* aunque a velocidades de reacción mucho más lentas (Wolf-Dieter, 1995). Una cepa de *C. freundii* puede fermentar el glicerol proveniente de la industria del biodiésel para producir $68,1 \text{ g L}^{-1}$ de 1,3-PDOL, con rendimiento de $12,5 \text{ mol 1,3-PDOL mol glicerol}^{-1}$ y productividad volumétrica de $0,79 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Metsoviti y col., 2013). Con *C. werkmanii*, los mejores valores alcanzados de rendimiento y productividad volumétrica en un cultivo semi-batch fueron $0,62 \text{ mol 1,3-PDOL mol glicerol}^{-1}$ y $2,84 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Maervoet y col., 2012). Sin embargo, los valores de rendimiento y productividad conseguidos con *C. freundii* son menores que los logrados con especies de *Clostridium*. Al evaluar una cepa de *C. freundii* en relación a dos cepas diferentes de *Enterobacter* en un medio con una concentración inicial de 20 g L^{-1} de glicerol puro, *C. freundii* fue capaz de fermentar el glicerol generando $3547 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1}$, con

un rendimiento de $0,94 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$, y generar entre 2-3 veces menos rendimiento a etanol que las restantes cepas ensayadas (Maru y col., 2013).

El empleo de una cepa de *Enterobacter aerogenes* para producir H_2 y etanol a partir de desechos que contienen glicerol, mostró que al diluir el glicerol a 80 Mm en un medio sintético, éste fue consumido completamente después de 24 h, produciendo $0,89 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$ y $1,0 \text{ mol etanol mol glicerol}^{-1}$. Además, la adición de EL y triptona (TT) al medio sintético aumentó las tasas de producción de H_2 y etanol (Ito y col., 2005). Para dos cepas de *E. aerogenes* (una nativa y otra mutante) evaluadas a pH 6,3, el rendimiento a H_2 fue del doble para la cepa mutante respecto de la cepa nativa (Nakashimada y col., 2002). Con glicerol crudo, se encontró que el metanol tiene un efecto negativo sobre la producción de H_2 entre $1,3$ a $3,3 \text{ g L}^{-1}$, mientras que NaCl mostró un efecto positivo entre $0,15$ a $0,55 \text{ g L}^{-1}$ (Sarma y col. 2013). Se observaron rendimientos prometedores de $0,79$ y $0,84 \text{ mol compuesto mol glicerol crudo}^{-1}$ para etanol e H_2 , respectivamente, con mayor velocidad que la reportada en otros ensayos (Jitrwung y col., 2013). Empleando un biorreactor (10 L) con *E. aerogenes*, la mayor productividad y rendimiento a H_2 se obtuvo a concentraciones menores a 2% v/v glicerol durante 6 días de operación, siendo de $650 \text{ mL g masa seca}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,89 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$, respectivamente (Markov y col., 2011). En un ensayo de optimización, el pH inicial, temperatura, y concentración de EL y glicerol tuvieron un efecto significativo sobre la productividad de H_2 y etanol, alcanzando $0,24$ y $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Reungsang y col., 2013). Otros ensayos determinaron rendimientos de $0,85$ y $0,95 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$ a concentración inicial de sustrato 15 y 21 g L^{-1} , respectivamente, empleando menor cantidad de sales que en reportes previos (Jitrwung y col., 2011).

Otro microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, considerado uno de los organismos más prometedores para la producción de 1,3-PDOL y 2,3-butanodiol a partir de glicerol crudo, son muy utilizados en la industria de productos químicos y combustibles líquidos (Wu y col., 2011). La formación de lactato y etanol compite con la formación de 1,3-PDOL a través del consumo de equivalentes de reducción, lo que generan dificultades en los procesos posteriores de purificación y recuperación de 1,3-PDOL (Yang y col., 2007; Zhang y col., 2006). Una cepa mutante de *K. oxytoca* presentó productividad y rendimiento a 1,3-PDOL de $0,83 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,53 \text{ mol 1,3-PDOL mol glicerol}^{-1}$, respectivamente (Yang y col., 2007). Una cepa mutante de *K. pneumoniae* generó menos etanol ($1,70 \text{ g L}^{-1}$) con mayor productividad ($1,07 \text{ g 1,3-PDOL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y rendimiento ($0,70 \text{ mol 1,3-PDOL mol}$

glicerol⁻¹) (Zhang y col., 2006). En condiciones de fermentación anaeróbica, los organismos del género *Klebsiella* son capaces de convertir el glicerol en productos solubles (1,3-PDOL, 2,3-butanodiol, etanol, ácido acético, ácido succínico) y gaseosos (H₂, CO₂) (Gupta y col., 2005). Con *K. pneumoniae*, las mayores productividades de H₂ y etanol fueron 11,76 y 6,8 mmol L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, con 50 g L⁻¹ glicerol inicial, mientras que 1,3- PDOL y 2,3-butanodiol alcanzaron valores máximos de 6,95 y 1,50 mmol L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, con 70 g L⁻¹ glicerol (Wu y col., 2011). Al limitar la concentración de glicerol, la formación de H₂ fue superior que la máxima cantidad generada a partir de la escisión del piruvato a acetil-CoA, mientras que bajo condiciones de exceso de glicerol, la formación de H₂ se redujo drásticamente y el excedente de NADH₂ fue utilizado para generar 1,3-PDOL; esto indica la existencia de enzimas que transfieren equivalentes reducidos flexiblemente desde NADH₂ a H₂ y 1,3- PDOL (Zheng y col., 1993). Con una cepa *K. pneumoniae* mutante, las condiciones óptimas fueron 40°C, pH 8, 20 g L⁻¹ glicerol crudo y 2 g L⁻¹ EL, generando una producción máxima de H₂ de 27,7 mmol H₂ L⁻¹ y rendimiento de 0,25 mol H₂ mol glicerol⁻¹ (Chookaew y col., 2012).

2.9.5.2.3.2 El género *Escherichia*

Aunque el género *Escherichia* agrupa a cinco especies, las cuales son *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*, esta última especie es el organismo modelo más ampliamente utilizado en biotecnología. *E. coli* es el sistema procariótico de expresión más empleado para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunas, debido a que tanto su fisiología como su genética han sido bien caracterizadas (Ferrer-Miralles y col., 2009). Además, tanto las cepas nativas como recombinantes pueden utilizarse como una robusta plataforma de trabajo para desarrollo de procesos fermentativos que tengan como objetivo la obtención de determinados productos metabólicos de gran valor agregado y/o energético para la industria (Chen y col., 2013). La obtención de diferentes compuestos de interés industrial a partir de *E. coli* ha sido enormemente favorecido, gracias al bajo costo de recursos necesarios para su cultivo, moderada patogenicidad, adecuada velocidad de crecimiento, posibilidad de trabajar con elevada densidad de cultivo, baja necesidad de suplementación con nutrientes complejos, por presentar facilidades en cuanto a su manipulación

genética, y por poseer compatibilidad en relación a diversas herramientas biotecnológicas actualmente disponibles (Murarka y col., 2008).

Un medio de cultivo comúnmente empleado para *E. coli* es el llamado LB, desarrollado por G. Bertani en 1951. Se trata de un medio nutricionalmente rico que posee TT, EL y NaCl (Bertani, 2004). La TT provee mayoritariamente fuentes de N y C; el EL provee determinados compuestos entre los que aparecen aminoácidos, vitaminas y elementos traza; mientras que el NaCl proporciona los iones sodio para el transporte y balance osmótico celular (Losen y col., 2004). Como el medio LB se caracteriza por una baja relación C/N, una alternativa de gran interés consiste en encontrar componentes que incrementen esta relación así como el rendimiento hacia el producto, sin encarecer el medio y que al mismo tiempo no presenten valor agregado (Ren y col., 2006). Los componentes proporcionarán el esqueleto carbonado básico para la síntesis de las unidades estructurales que dan origen a las macromoléculas y estructuras de la célula (García y col., 2013). La fuente de carbono más tradicionalmente utilizada es la glucosa, la cual deriva en la producción de metanol y ácidos orgánicos, junto con otros productos en menor proporción (Mohd Yusoff y col., 2012). Además, existen numerosos estudios previos referidos a formulaciones de medios que incluyen otros azúcares como sacarosa, fructosa, lactosa, xilosa, entre otros (García y col., 2013); sin embargo, estos compuestos no corresponden a materias primas ampliamente disponibles y a su vez no son productos de bajo valor agregado. Por estos motivos, es de primordial importancia encontrar otras fuentes de carbono que cumplan con los requisitos anteriormente mencionados y sean completamente metabolizados por la maquinaria enzimática de *E. coli*. Un compuesto de particular importancia es el glicerol crudo proveniente de la industria de producción del biodiésel, debido a que representa 10% p/p del producto final (Zhou y col., 2008) y su precio en el mercado global ha declinado un 90% en el período 2006-2009 (Yazdani y González, 2007). El glicerol crudo tiene una creciente importancia en muchos países del mundo, mientras que en Argentina, y particularmente en la provincia de Santa Fe (Gran Rosario) la expansión de la industria del biodiésel provocó que el glicerol se convierta en una fuente de carbono abundante y económica.

Los principales productos de la fermentación del glicerol mediante la utilización de diferentes *E. coli* modificadas genéticamente fueron etanol, ácido láctico, 1,2-PDOL, 1,3-PDOL y ácido succínico, así como H₂ gaseoso, los cuales representan compuestos de importante valor agregado. El etanol es sintetizado para cumplir con

el requerimiento energético celular, y en la industria tiene aplicabilidad como combustible o aditivo de naftas (Cardona y Sánchez, 2007). Una cepa mutante que posee inactivadas las enzimas responsables de la síntesis de succinato y acetato, y cuyo camino metabólico se muestra en la **Figura 2.15**, fue capaz de producir 1 mol de etanol y 1 mol de H₂ por mol de glicerol (Yazdani y González, 2008).

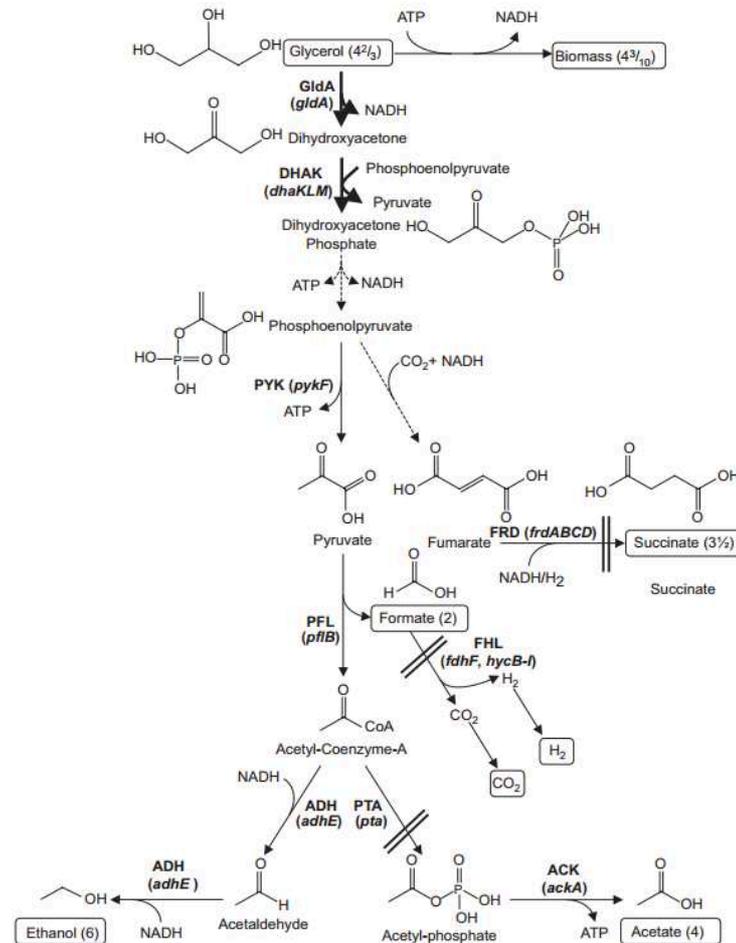


Figura 2.15: Principales vías metabólicas y expresiones génicas involucradas en la fermentación anaeróbica de glicerol en *E. coli* MG1655 (Murarka y col., 2008; Gonzalez y col., 2008). Las modificaciones genéticas propuestas son ilustradas por líneas gruesas (sobreexpresión de *gldA* y *dhaKLM*) o barras dobles (interrupción de *frdA*, *pta*, y *fdhF*), mientras que las líneas discontinuas ilustran varios pasos (Yazdani y González, 2008).

La utilización del glicerol en ausencia de aceptores de electrones está mediada por la glicerol deshidrogenasa y dihidroxiacetona quinasa (González y col., 2008). El ácido láctico tiene aplicaciones como aditivo alimentario, acidulante, y en la producción de ácido poliláctico (Okano y col., 2010). Lactato con elevada pureza fue generado utilizando una *E. coli* recombinante, sobreexpresando enzimas que responden a intermediarios glucolíticos e inactivando la fosfato acetiltransferasa,

fumarato reductasa, alcohol acetaldehído deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa (Mazumdar y col., 2010). Para aumentar la producción natural de 1,2-PDOL, se construyó una *E. coli* con interrupción en la síntesis de acetato y lactato, y sustitución de la DHA quinasa dependiente de PEP nativa por una DHA quinasa dependiente de ATP de *C. freundii*, permitiendo sobreexpresar las enzimas responsables de la síntesis de 1,2-PDOL (Clomburg y Gonzalez, 2011). Una cepa recombinante de *E. coli* se construyó por transferencia de un gen que codifica para la enzima glicerol deshidratasa dhaB1 y su factor de activación dhaB2 de *C. butyricum* (Tang y col., 2009). El succinato es utilizado en la fabricación de polibutileno succinato biodegradable (Werpy y Petersen, 2004). El rendimiento de ácido succínico aumentó con una *E. coli* recombinante, siendo incrementada la actividad PEP carboxiquinasa, y suprimidos los genes responsables de la formación de etanol y formiato (Zhang y col., 2010).

E. coli puede fermentar glicerol de forma anaeróbica y dependiente del pH, debido a que esta fermentación está vinculada a la disponibilidad de CO₂ producida por la enzima formiato hidrógeno liasa (FHL) en condiciones ácidas. Esto fue corroborado al suplementar CO₂ en un medio con una cepa deficiente en FHL, donde la capacidad de fermentar el glicerol fue restaurada. Además, un alto pH resulta en una baja generación de CO₂ (baja actividad FHL) y menor disponibilidad (CO₂ se convierte en bicarbonato), y en consecuencia la fermentación del glicerol resulta ser muy ineficiente (Dharmadi y col., 2006). Por otra parte, las condiciones de cultivo indican que la acumulación de H₂ demostró ser un factor determinante en la fermentación de glicerol. El efecto negativo del H₂ está relacionada con su reciclaje metabólico, el cual genera un estado redox interno muy desfavorable (Murarka y col., 2008).

Bajo condiciones anaeróbicas, *E. coli* convierte el glicerol a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a través de la vía fermentativa (gldA-dhaKLM) o la vía respiratoria anaerobia (glpK-GlpABC) (Durnin y col., 2009). La DHAP se convierte a piruvato, que luego se desdobla en formiato y acetil-CoA por la enzima piruvato formiato liasa (codificada por pflB), y finalmente el complejo enzimático FHL convierte el formiato en H₂ y CO₂ (Rossmann y col., 1991). *E. coli* emplea cuatro [Ni-Fe] hidrogenasas, las cuales poseen una pequeña subunidad con agrupaciones de hierro-azufre que participan en la transferencia de electrones, y una subunidad mayor que contiene el sitio activo níquel-hierro (Vardar-Schara y col., 2008). Generalmente, la hidrogenasa 1 (Hyd-1) e hidrogenasa 2 (Hyd-2) oxidan al H₂

(Dubini y col., 2002). La hidrogenasa 3 (Hyd-3) es una parte del complejo FHL, y produce H_2 a partir de formiato (Rossmann y col., 1991). No se detectó la actividad de la hidrogenasa 4 (Hyd-4), debido a que los genes que la codifican no fueron expresados en niveles significativos (Self y col., 2004). Estas enzimas poseen actividad reversible (síntesis de H_2 o producción de H^+ y e^-), lo cual juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo de H_2 en diferentes ambientes (Trchounian y col., 2011).

Un reciente estudio pudo confirmar que las hidrogenasas Hyd-1 e Hyd-4 no son las principales enzimas involucradas en la producción de H_2 en medio mínimo con glicerol, ya que la supresión de los genes de las correspondientes subunidades grandes (*hyaB* para Hyd-1 y *hyfG* para Hyd-4) no afectó el crecimiento celular, el consumo de glicerol, ni la producción de H_2 , ácidos orgánicos, o etanol (Sánchez-Torres y col., 2013). Por el contrario, se requieren la actividad de Hyd-2 e Hyd-3 para el metabolismo óptimo del glicerol, ya que las supresiones de los genes *hybC* (Hyd-2) e *hycE* (Hyd-3) reducen la aptitud de las células, el consumo de glicerol y la producción de succinato, aumentando la producción de acetato. La inactivación de Hyd-3 perjudica la producción de H_2 e incrementa la producción de formiato, mientras que la inactivación de Hyd-2 perjudica la producción de H_2 a pH 7,5 pero no tiene efecto sobre el H_2 a pH 6,5. Durante la fermentación anaeróbica de glicerol, Hyd-3 es la principal hidrogenasa responsable en la generación de H_2 a través del complejo FHL, mientras que Hyd-2 tiene más influencia en la utilización de glicerol. Por lo tanto, las actividades de las enzimas Hyd-2 y Hyd-3 parecen ser necesarias para la óptima utilización de glicerol y el mantenimiento del equilibrio redox celular (Sánchez-Torres y col., 2013).

El mayor conocimiento de las vías metabólicas y de las principales enzimas involucradas en la fermentación del glicerol, facilitó aún más el desarrollo de diferentes cepas de *E. coli* mediante ingeniería genética para incrementar el rendimiento y la producción de H_2 . Con la cepa *E. coli* K12, el incremento de la concentración de glicerol entre 10 y 50 g L^{-1} demostró un aumento en la fermentación del glicerol. Los rendimientos de H_2 y etanol fueron los más bajos con la menor concentración de glicerol, mientras que la máxima producción de H_2 (32,15 mmol L^{-1}) se observó a concentración inicial de 25 g L^{-1} (Chaudhary y col., 2011). En sendos ensayos con la cepa *E. coli* BW25113, se generaron similares valores de productividad de H_2 , siendo de 0,125 y 0,127 mmol $L^{-1} h^{-1}$, sin embargo el primer valor fue reportado para un cultivo a 12 h de ensayo (Dimanta y col.,

2013), mientras que el restante fue el valor reportado a 24 h de ensayo (Hu y Wood, 2010). Con la cepa *E. coli* HB41 durante 36 h de ensayo, la mayor producción de H_2 se obtuvo a partir de los medios preparados con sales $FeSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, y KH_2PO_4 . Al adicionar 1% NaCl el rendimiento a H_2 disminuyó de manera importante, siendo de $0,92 \text{ mol } H_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$; 2% NaCl generó la menor producción de H_2 , y no se produjo H_2 con 3% NaCl (Yuwa-amornpitak, 2012).

Un estudio de gran relevancia fue realizado a partir de la cepa *E. coli* BW25113 frdC (C_{CON}), que carece de la enzima fumarato reductasa, y cuya mutación reduce la represión de la síntesis de H_2 durante la fermentación de glicerol, debido a que se minimizó la síntesis de succinato, un subproducto que compete con la producción de H_2 (**Figura 2.16**) (Hu y Wood, 2010). Este organismo fue inicialmente obtenido desde la colección Keio (Baba y col., 2006), y a partir del mismo se han desarrollado etapas sucesivas de evolución adaptativa y mutagénesis química, combinadas con un estricto método de selección de cepas que presenten un adecuado crecimiento en glicerol. La cepa fue primero modificada mediante un proceso de evolución adaptativa, realizado anaeróbicamente en fermentaciones sucesivas (78 pasajes) en un medio de cultivo con glicerol y empleando kanamicina como agente de selección. Luego, la cepa fue tratada mediante un procedimiento de mutagénesis química con nitrosoguanidina (Miller, 1972) y expuesta a una segunda ronda de evolución adaptativa (15 pasajes), siguiendo idéntico procedimiento al anterior (Hu y Wood, 2010). El resultado fue la obtención de una cepa mejorada (C_{HW2}), que produce 20 veces más H_2 ($0,68 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y crece 5 veces más rápido que la cepa original ($0,25 \text{ h}^{-1}$) en un medio con glicerol. La actividad de la enzima glicerol deshidrogenasa (que transforma glicerol a DHA) en C_{HW2} se incrementó 4 veces respecto de C_{CON} , junto con un aumento en la actividad de la enolasa (genera fosfoenolpiruvato a partir de glicerato-2-P). También fueron identificadas represiones en ciertas vías metabólicas que disminuyen el rendimiento a H_2 , como las enzimas aldolasas (gatYZ) y fructosa 1,6-bifosfatasa (fbp), que consumen el glicerol-3-P de la vía principal del metabolismo de glicerol, así como en el transportador que libera formiato hacia el periplasma celular (focA) (**Figura 2.16**) (Hu y Wood, 2010).

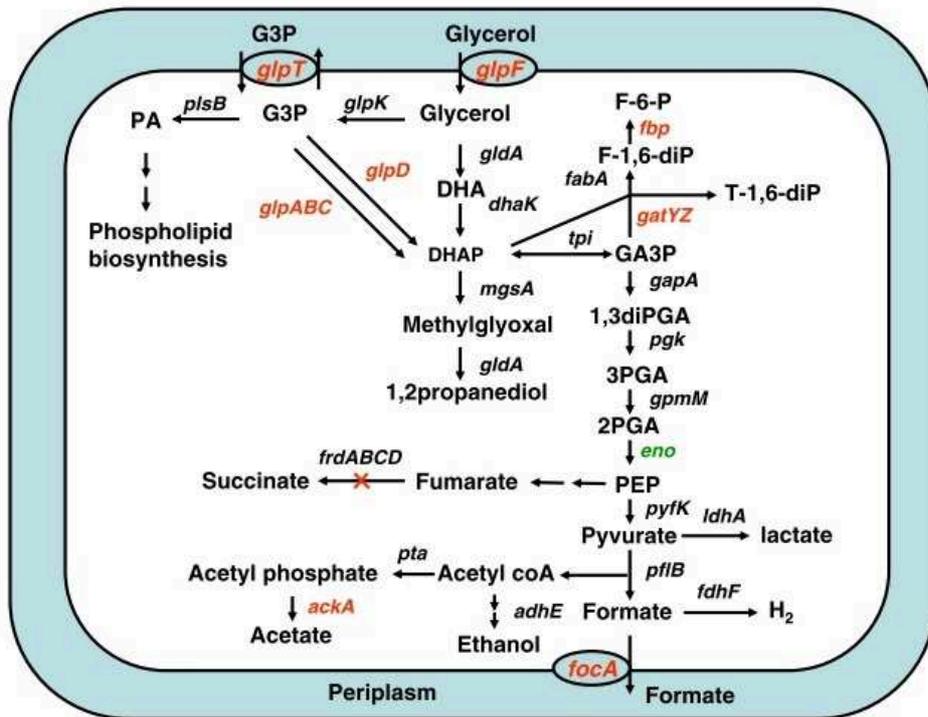


Figura 2.16: Principales vías metabólicas y expresiones génicas involucradas en la síntesis de H₂ para la cepa de *E. coli* modificada (C_{HW2}), en relación a la cepa BW25113 *frdC* (C_{CON}). En rojo aparecen los genes que fueron reprimidos y en verde los genes inducidos (Hu y Wood, 2010).

2.9.6 Quimiometría

Todos los bioprocesos requieren la adopción de un sistema de análisis y ensayo, el cual, debido a las actividades características de la biotecnología, puede ser cubierto eficientemente por la quimiometría. Esta es la disciplina dentro del área de la química, que emplea la matemática, estadística y lógica formal con la finalidad de seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proveer la mayor cantidad de información de interés a través del análisis de datos, y favorecer la calibración, validación y significancia de las mediciones analíticas (Massart y col., 1997). Existen numerosas técnicas para la correcta recolección de datos (optimización de parámetros experimentales, diseño de experimentos, calibración, procesamiento de señales) y para obtener información a partir de estos (estadística, reconocimiento de patrones, modelado, entre otros).

Como la quimiometría se fundamenta en gran medida en la experimentación, se debe diseñar cuidadosamente para que brinde la información buscada, en relación a la cantidad de recursos disponibles y los gastos necesarios para su

ejecución. Cuando el tipo de estudio a realizar queda definido y las hipótesis de investigación son expresadas, el investigador debe desarrollar un diseño de investigación y aplicarlo al contexto particular de su estudio. Al realizar el diseño, debe definirse un número limitado de factores y los niveles en los que dichos factores se evaluarán. Un factor es cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento, mientras que los niveles de un factor son los diferentes valores que dicho factor toma. Además, el efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor, y se lo conoce como efecto principal (Miller y Miller, 1993). Intentar realizar en la práctica el estudio de todos los factores potenciales, es una tarea que insume demasiado tiempo y dinero, lo cual lo hace un trabajo imposible. Sólo pueden ser investigados los efectos de los factores seleccionados, mientras que los demás factores (desconocidos) deberían ser mantenidos tan constantes como sea posible. Si al final del experimento se pretende que las conclusiones obtenidas sean correctas, se deben identificar los factores que influyen en el resultado e intentar controlarlos (Miller y Miller, 1993).

Cuando se realiza la formulación de un medio de cultivo, un paso de marcada importancia es la optimización de las concentraciones de los componentes, pues estas influyen directamente sobre la cantidad de biomasa producida y los rendimientos del ensayo (Nikerel y col., 2006). Para lograr dicha optimización, se emplea el método univariado, el cual consiste en variar un único factor mientras los demás se mantienen constantes. Los problemas del método aparecen ante la necesidad de requerir un elevado número de experimentos, sin garantizar el hallazgo de la combinación óptima de factores debido a la falta de análisis de las interacciones presentes entre ellos (Leardi, 2009, Montgomery, 1991).

Una serie de técnicas alternativas al método univariado son utilizadas debido a que presentan una mayor eficiencia. Una de ellas corresponde a la metodología de superficie de respuesta (RSM), la cual se basa en el ajuste cuadrático por cuadrados mínimos (QLS), y corresponde a una herramienta de gran utilidad para su operador debido a que agiliza la forma de encontrar las condiciones óptimas de un determinado proceso, ahorrando en gran medida tiempo, dinero y recursos.

2.9.6.1 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas estadísticas basadas en el uso de análisis multivariado, y es ampliamente utilizada en el diseño de experimentos, construcción de modelos, evaluación de efectos simultáneos de varios factores y búsqueda de condiciones óptimas de un proceso con limitado número de experimentos, con el objetivo de optimizar la variable de interés (Tabandeh y col., 2008; Peregrina Peña, 2000).

Cuando se aplica RSM a través de QLS, son empleados modelos matemáticos para construir una superficie que describe la relación entre los factores y la respuesta. La forma canónica del modelo cuadrático se representa según:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3.13)$$

donde y es la respuesta, k es el número de factores, β_0 es el término independiente, β_i son los coeficientes de los parámetros lineales, x_i y x_j son los factores (con $i \neq j$), y ε es el residuo asociado a los experimentos. En el segundo miembro de la **Ecuación 3.12**, el segundo término representa la contribución lineal de los factores; el tercero describe los efectos cuadráticos de los factores; y el cuarto constituye la interacción entre diferentes factores, con $x_i \neq x_j$ (Almeida Bezerra y col, 2008). Cuando el sistema presenta curvatura en la respuesta, esto nos indica que existe al menos un término de segundo orden (de Aguiar y col., 1995). La **Ecuación 3.12** se ajusta generalmente por el método de cuadrados mínimos, técnica de análisis numérico en la que, teniéndose un conjunto de pares ordenados (variable independiente, variable dependiente) y una familia de funciones, se intenta encontrar, dentro de dicha familia, la función que mejor se aproxima a los datos, de acuerdo con el criterio de mínimo error cuadrático. Para esto, se busca minimizar la suma de cuadrados de los residuos entre los puntos generados por la función y los que corresponden a los datos (Plackett, 1972).

El Diseño Central Compuesto (DCC), uno de los diseños más empleados, surge de combinar un diseño factorial a dos niveles y un diseño estrella, constando en total de 3 partes: un diseño cúbico, en el cual el número de experimentos está dado por $N=2^K$ (siendo K el número de factores); un diseño estrella, que se realiza agregando más niveles a una distancia α del centro, siendo $2K$ el número de puntos axiales; y un punto central (N_0) con los niveles de todos los factores iguales al valor

central, del que suelen prepararse 5 o más replicados. Normalmente se realizan 5 o más replicados debido a que en la construcción del diseño, se asume que el error experimental se relaciona con la distancia al centro del mismo, aunque a veces también es función de la distancia a los otros experimentos.

Para satisfacer la condición de dependencia únicamente de la distancia al centro del diseño y la independencia de los otros experimentos, se usa un diseño central compuesto rotatable, en el que los puntos de la estrella son definidos por $\pm\alpha = (2^K)^{1/4}$. Así, un diseño experimental es rotatable cuando la rotación del diseño sobre el punto central no altera los contornos de variancia, lo que significa que la variancia de la respuesta y predicha en algún punto x es función de la distancia al punto desde el centro del diseño y no de la dirección (Araujo y Brereton, 1996; Myers y Montgomery, 1995). Dado que la RSM se centra en la optimización y no se conoce la ubicación del óptimo antes de comenzar el experimento, debe emplearse un diseño que proporcione estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones.

El QLS sólo es útil para aproximaciones cuadráticas; se observa que funciones más complejas requieren un número mayor de experimentos (Desai y col., 2008). RSM basado en QLS permite estimar las relaciones entre una o más variables independientes (o de entrada) y una o más variables dependientes (o de salida, llamadas respuestas). Para este método, se plantea un modelo que potencialmente explique las relaciones que ocurren entre variables dependientes e independientes.

Estas técnicas han probado ser de enorme utilidad para el diseño, desarrollo, mejoramiento y optimización de bioprocesos a escala industrial (Didier y col., 2007; Almeida Bezerra y col., 2008). La técnica de RSM basada en QLS ha sido ampliamente utilizada en diversos trabajos, como en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos (Giordano y col., 2013), extracción de polisacáridos (Yin y col., 2011), intensificación del almacenamiento de lípidos en *Chlorella sp.* (Giordano y col., 2014), y en la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Hao y col., 2006) y bioinsecticidas (Moreira y col., 2007), entre muchos otros.

2.9.6.2 Función Deseabilidad

El cálculo de la función deseabilidad es un método empleado para optimizar procesos con múltiples respuestas. Se basa en el concepto de que la calidad de un proceso o producto con al menos una característica no incluida en un límite

deseable, no es aceptable. Por este motivo, el desafío es encontrar condiciones operativas que garanticen la obtención de un valor de respuesta deseable.

La función deseabilidad parcial o individual (d_i) asigna un valor entre 0 y 1 para cada combinación de factores. Si el valor es 0, implica una combinación no deseable, mientras si es 1 asegura que toda una respuesta en particular tiene un valor deseable simultáneamente. La construcción de funciones de deseabilidad parcial depende de si cada respuesta ($Y_i(x)$) debe ser maximizada, minimizada, tener un valor dentro de un rango establecido o un valor objetivo.

Si la respuesta debe tener un valor objetivo, la función deseabilidad parcial es:

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } y_i < L_i \\ \left(\frac{(y_i(x) - L_i)}{T_i - L_i}\right)^{wt_i} & \text{si } L_i \leq y_i \leq T_i \\ \left(\frac{(y_i(x) - U_i)}{T_i - U_i}\right)^{wt_i} & \text{si } T_i \leq y_i \leq U_i \\ 0 & \text{si } y_i > U_i \end{cases} \quad (3.14)$$

donde L_i es el límite inferior, U_i es el límite superior y T_i representa el valor objetivo para la respuesta $y_i(x)$, con $L_i \leq T_i \leq U_i$, wt_i es el peso y su función es darle énfasis a los límites superior o inferior, o al valor objetivo. Si el peso es 1, d_i varía linealmente entre 0 y 1. Si el peso es menor o mayor a 1, esto da menor o mayor énfasis al objetivo, respectivamente (Derringer y Suich, 1980).

Si se busca maximizar la respuesta, la función deseabilidad parcial queda como:

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } y_i(x) < L_i \\ \left(\frac{(y_i(x) - L_i)}{U_i - L_i}\right)^{wt_i} & \text{si } L_i \leq y_i(x) \leq U_i \\ 1 & \text{si } y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (3.15)$$

Si se desea minimizar la respuesta, la función deseabilidad parcial es:

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 1 & \text{si } y_i(x) < L_i \\ \left(\frac{(U_i - y_i)}{U_i - L_i}\right)^{wt_i} & \text{si } L_i \leq y_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (3.16)$$

Cuando el objetivo se centra en que la respuesta se encuentre en un rango, la función deseabilidad parcial se construye según:

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 1 & \text{si } L_i \leq y_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } L_i < y_i(x) \text{ o } y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (3.17)$$

El valor de la función deseabilidad global (D) se obtiene al combinar las funciones de deseabilidad parciales. Se debe buscar que D tenga el mayor valor posible al elegir los valores óptimos de cada uno de los factores. La ecuación que la describe es:

$$D = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{1/\sum_{i=1}^n r_i} \quad (3.18)$$

donde D es la función deseabilidad global y r_i es la importancia relativa asignada a cada respuesta, que implica un menor o mayor énfasis, dependiendo de su valor, y puede ser asignada a cada una de las deseabilidades parciales. De igual manera que las funciones de deseabilidad parciales, la función deseabilidad global puede variar entre 0 (condiciones que no satisfacen al menos uno de los requerimientos) y 1 (todas las respuestas tienen valores deseables, simultáneamente). La mejor combinación de factores será la que obtenga el mayor valor de D . Además, si se logra combinar RSM con la función deseabilidad global, podrá obtenerse una herramienta muy eficaz y aplicable para la determinación de las condiciones operativas óptimas del sistema bajo estudio (Tabandeh y col., 2008).

Una vez finalizado el procesamiento de toda la información, es posible obtener un modelo que explique las relaciones entre las diferentes variables del sistema. Los objetivos planteados al realizar una experimentación son definir los valores de los factores a investigar (conocimiento inicial del sistema), determinar la influencia de los factores sobre las respuestas de interés (identificación de influencias e interacciones entre factores), optimizar la/s respuesta/s (identificación de valores que dan mejores respuestas), y determinar el efecto de variaciones no controladas sobre la/s respuesta/s (determinación de la robustez) (Massart y col., 1997).

El marcado interés relacionado al estudio de los procesos catalíticos y los sistemas biológicos para la transformación del glicerol reside en el valor actual que posee este compuesto, dado que representa un subproducto de una industria en constante crecimiento, y que al mismo tiempo es económico, renovable y abundante, lo que permite contribuir a un desarrollo medioambiental más sostenible y a producir menores niveles de contaminación. La obtención de compuestos con valor agregado y/o energético, como H_2 y GS, a través de ambas vías, incrementa enormemente el valor de esta materia prima debido a que se generan productos de gran aplicabilidad y utilidad industrial, así como energía que puede ser empleada en la agricultura, en el ámbito doméstico, y no menos importante en el sector de

transporte, lo que permitirá mejorar el sistema de producción y al mismo tiempo generar un impacto medioambiental relativamente bajo. Finalmente, aunque ambas vías presentan diferencias entre sí, las ventajas propias de cada proceso permiten efectuar estudios cada vez más intensivos en estas áreas, realizando aportes que permitan dilucidar los mecanismos involucrados y de esta manera producir mayores conocimientos respecto a esta temática de remarcado interés actual.

Capítulo 3



Materiales y Métodos

3.1 Procesos catalíticos

3.1.1 Preparación de catalizadores

3.1.1.1 Acondicionamiento del soporte

Los catalizadores se prepararon utilizando como soporte una muestra comercial de alúmina (γ - Al_2O_3) (CK-300, Akzo Nobel), que presenta una superficie específica de $199 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y volumen de poros de $0,51 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ según especificaciones del fabricante. Los pellets comerciales (cilindros de 0,2 cm D.E. x 0,8 cm longitud) fueron molidos con un mortero de cerámica y tamizados, recuperando la fracción 35-80 mesh para la preparación. Los finos de γ - Al_2O_3 fueron prensados en un pastillero de metal a una presión de 0,4 MPa, y las pastillas formadas fueron luego molidas y tamizadas para reutilizar la fracción 35-80 mesh. El material fue previamente calcinado en un reactor de cuarzo y en corriente de aire (50 mL min^{-1}), con una rampa de calentamiento de 5°C min^{-1} hasta 600°C , manteniendo esta temperatura por 3 h, y enfriado hasta temperatura ambiente. Previo a su utilización, el material fue acondicionado en estufa a 110°C durante 1 h y enfriado hasta temperatura ambiente en desecador para evitar la absorción de humedad ambiente.

3.1.1.2 Preparación de las soluciones de metales

En base a estudios previos (Sanchez, 2010), se evaluó la preparación de catalizadores de níquel sobre alúmina con cargas de 4,0 y 5,0% p/p de Ni. El precursor de Ni utilizado fue nitrato de níquel hexahidratado ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Anedra). Los metales cobalto y cerio se seleccionaron como elementos promotores a agregar en los catalizadores de Ni sobre Al_2O_3 . Se seleccionó el material con una carga de 4,0% p/p de Ni se seleccionó para evaluar 4,0 y 12,0% p/p de Co, mientras que el material con 5,0% p/p de Ni para evaluar 2,0; 4,0 y 6,0% p/p de Ce. Los precursores de Co y Ce fueron las sales de sodio hexanitrocobaltato (III) ($\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$, Sigma) y nitrato de cerio hexahidratado ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Alfa Aesar), respectivamente.

Para realizar los cálculos, se tuvo presente el límite de solubilidad de las sales empleadas, siendo 940, 720 y 1754 g L^{-1} en agua a 20°C , para $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ y $\text{Ce}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. Las concentraciones finales de las soluciones de metales a preparar fueron calculadas considerando la carga de metal a depositar sobre el soporte y el volumen de poro del mismo, el cual equivale

al volumen de solución a utilizar. La fórmula empleada para el cálculo de cada concentración fue:

$$C_{sol} = \frac{L}{V_P} \quad (3.1)$$

siendo:

C_{sol} : concentración de la solución de metal [g metal L⁻¹].

L : carga de metal en el catalizador [g metal (100 g catalizador)⁻¹].

V_P : volumen de poro del soporte [L (g catalizador)⁻¹].

De esta manera, las concentraciones de las soluciones preparadas fueron: 78,4 y 98,0 g Ni L⁻¹; 78,4 y 235,2 g Co L⁻¹; y 39,2; 78,4 y 117,6 g Ce L⁻¹.

3.1.1.3 Impregnación del soporte

Las impregnaciones sobre el soporte γ -Al₂O₃ se realizaron utilizando la técnica de humedad incipiente. El procedimiento de impregnación consistió en agregar, utilizando una bureta graduada, la solución del metal precursor gota a gota sobre un vaso de precipitado conteniendo el soporte, hasta humedecer toda la masa, y manteniendo una constante agitación manual. El punto final de la impregnación se observa cuando las partículas húmedas del soporte permanecen bien unidas aún con vigorosa agitación. El volumen de solución agregada (expresado en mL) debería coincidir con el volumen de poro del soporte (expresado en mL g⁻¹), pudiendo cometer un error de $\pm 5\%$ del valor normal. En caso de diferir del valor real, el volumen de solución utilizado se comparó con el calculado, de forma de realizar el ajuste de la carga de metal obtenida.

Los materiales preparados a partir de las soluciones de Ni y Ce, así como el correspondiente a la menor carga de Co, fueron impregnados directamente en una única etapa, mientras que fueron necesarias dos impregnaciones sucesivas para llegar a obtener el material con 12,0% p/p de Co, dado que el límite de solubilidad de la sal impedía la impregnación en una sola etapa. Finalizada cada impregnación, los materiales fueron mantenidos en desecador a temperatura ambiente durante 4 h para permitir que las especies metálicas interactúen con el soporte. Luego, cada catalizador fue colocado en estufa a 110°C durante toda la noche, para eliminar el agua por evaporación. Las muestras impregnadas fueron identificadas como yMe_xNi/Al_2O_3 , donde “y” corresponde a la carga de promotor adicionada, “Me” corresponde al metal adicionado como promotor (Co o Ce), mientras que “x” representa la carga de Ni depositada sobre el soporte γ -Al₂O₃.

3.1.1.4 Pretratamiento del material impregnado

Los catalizadores preparados fueron pretratados en un reactor tubular de cuarzo (1,2 cm D.I. x 30,0 cm longitud), de lecho fijo y flujo continuo descendente, con calefacción proporcionada por un horno eléctrico con controlador-programador de temperatura (N2000, Novus) y termocupla tipo K. Cada catalizador recibió un pretratamiento particular, de acuerdo a lo reportado en la bibliografía existente y de acuerdo a las especies presentes.

Todos los catalizadores fueron calcinados en corriente de aire (50 mL min^{-1}). Para los materiales $4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ se empleó una rampa de calentamiento de 8°C min^{-1} hasta 500°C , manteniendo esta temperatura durante 3 h. Para $4\text{Co}-4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $12\text{Co}-4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, se usó una rampa de calentamiento de 4°C min^{-1} hasta 500°C , manteniendo esta temperatura por 2 h. Para $2\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $4\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $6\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, la rampa de calentamiento fue 8°C min^{-1} hasta 500°C , manteniendo esta temperatura durante 3 h. Luego de cada calcinación, los materiales fueron enfriados hasta temperatura ambiente en corriente de N_2 (40 mL min^{-1}). Finalmente, los materiales fueron reducidos en corriente de H_2 (100 mL min^{-1}). Para $4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ se utilizó una rampa de calentamiento de 5°C min^{-1} hasta 300°C , manteniendo esta temperatura durante 3 h, mientras que para $4\text{Co}-4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $12\text{Co}-4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ la rampa fue 5°C min^{-1} hasta 400°C , manteniendo la temperatura por 3 h. Con $2\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $4\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $6\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, la rampa de calentamiento fue 5°C min^{-1} hasta 600°C , manteniendo la temperatura 3 h.

3.1.2 Caracterización físicoquímica de materiales

3.1.2.1 Espectroscopía de Emisión Óptica por Plasma Inductivo

El análisis elemental de los metales presentes en los catalizadores (níquel, cobalto y cerio) se realizó usando espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), con un equipo Optima 2100 DV (Perkin Elmer), usando un detector CCD conectado a una computadora con un software especial de adquisición de datos. Antes de efectuar las mediciones, los catalizadores reducidos (condiciones en sección 3.1.1.4) fueron molidos hasta obtener un fino polvo, y colocados en estufa a 110°C durante 2 h para permitir su acondicionamiento. Luego, se efectuó el pesado exacto de cada muestra con balanza analítica (AUY 220, Shimadzu) y se procedió a realizar una digestión con

una mezcla de ácidos clorhídrico y nítrico (ambos P.A., Cicarelli), en una relación 3:1, empleando un digestor rotativo (Start D, Millestone). Posteriormente, las muestras fueron llevadas a volumen final de trabajo e inyectadas en el equipo.

3.1.2.2 Adsorción física de N_2

El área superficial específica, volumen de poros, diámetro medio de poros y distribución de tamaño de poros de los materiales fueron determinados mediante un sortómetro (Autosorb-1C, Quantachrome), conectado a una computadora que posee un software especial de adquisición de datos. Pevio a las mediciones, las muestras reducidas (condiciones en sección 3.1.1.4) fueron secadas en estufa a 110°C durante 24 h. Para cada experiencia, entre 50 y 100 mg de muestra fueron cargados en un reactor tubular de cuarzo abierto en un solo extremo (0,4 mm D.I. x 25,0 cm longitud, con un bulbo en el extremo inferior) y conectadas en el Puerto 1, para el desgasado a 200°C durante 2,5 h con una presión de 1,0 MPa. Luego, el reactor fue transferido al Puerto 2, iniciando posteriormente el análisis que permite obtener las isotermas de adsorción en el rango completo de presiones relativas, empleando N_2 líquido a -196°C. El área superficial específica se calculó a partir del método BET, el diámetro medio de poros con el método BJH, y la distribución de tamaño de poros con la ecuación de Kelvin, empleando el valor de 16,2 Å² como el área de sección transversal que presenta la molécula de N_2 físicamente adsorbida.

3.1.2.3 Difracción de Rayos X (DRX)

La estructura cristalina de los materiales fue determinada empleando un difractómetro de rayos X (XD-C1, Shimadzu) equipado con goniómetro de geometría Bragg-Brentano $\theta/2\theta$, conectado a una computadora con software de adquisición de datos, disponible en CENACA. Las muestras, previamente reducidas (condiciones en sección 3.1.1.4) y secadas en estufa a 110°C durante 24 h, fueron molidas a punto talco en mortero de ágata y colocadas en portamuestra de vidrio. La detección se realizó utilizando radiación K_α de Cu (1,5406 Å), velocidad de barrido 1° min⁻¹, voltaje 30 kV y corriente 40 mA, evaluando el ángulo de difracción para 2θ en modo continuo entre 10 y 90°. A partir de los análisis DRX, se calcularon los diámetros de cristal de NiO para cada catalizador, utilizando la ecuación de Scherrer (Cullity y Stock, 2001), mediante la línea de difracción de NiO a $2\theta = 43,3^\circ$:

$$T_c = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta} = \quad (3.2)$$

siendo:

T_c : tamaño de cristal (similar al tamaño medio de los dominios cristalinos) [Å].

k : constante de forma (0,9 para cristales esféricos) [adimensional].

λ : longitud de onda de los rayos X [Å].

β : ancho del pico de máxima intensidad a la altura media (FWHM) [radianes].

θ : ángulo de Bragg [grados].

3.1.2.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada Fourier (FTIR)

Las frecuencias características de los grupos químicos presentes en los materiales fueron analizadas utilizando un espectrómetro infrarrojo (IR Prestige-21, Shimadzu) con un detector de temperatura controlada de alta sensibilidad (DLATGS), conectado a una computadora con el software de adquisición de datos, disponible en CENACA. Las muestras, que fueron previamente reducidas (condiciones en sección 3.1.1.4) y secadas en estufa a 110°C durante 24 h, se diluyeron al 1% con bromuro de potasio (KBr, Merck) y molidas en mortero de ágata, para asegurar una muestra finamente particulada y homogénea. Luego, se preparó un disco fino por prensado a 0,4 MPa, de aproximadamente 1 cm de diámetro, suficientemente resistente para ser colocado en una celda de cuarzo y transparente para ser atravesado por el haz de luz incidente que emite en toda la región del infrarrojo. La celda de trabajo posee dos ventanas de CaF_2 en cada extremo y opera bajo completo vacío. La medición del espectro se realizó en la región comprendida entre 4000 a 1000 cm^{-1} , empleando resolución de 4 cm^{-1} , apertura de fuente de 1,8 y realizando 40 escaneos por medida.

3.1.2.5 Reducción a Temperatura Programada (RTP)

La reducibilidad de las especies presentes se estudió utilizando un equipo de RTP (TP2002S, Ohkura), conectado a una computadora con el software de adquisición de datos, disponible en CENACA. Las muestras, sin pretratar, fueron secadas en estufa a 110°C durante 24 h. Para cada experiencia, 50 mg de muestra fue cargada en un reactor tubular de cuarzo (0,6 cm D.I. x 24,0 cm longitud), soportando el material sobre un lecho de lana de cuarzo, siendo operado con flujo continuo descendente y calefacción proporcionada por un horno eléctrico con

controlador-programador de temperatura y termocupla tipo K (Omega). El lecho de lana de cuarzo fue reemplazado entre diferentes muestras para evitar las contaminaciones cruzadas. Previo a cada ensayo, las muestras fueron calcinadas *in-situ* en corriente de aire (50 mL min^{-1}), con rampa de calentamiento de 8°C min^{-1} hasta 500°C , manteniendo esta temperatura por 3 h, enfriando luego en corriente de N_2 (100 mL min^{-1}) hasta temperatura ambiente. La reducción final se efectuó en corriente de 1,8% de H_2 en Ar (100 mL min^{-1}), con rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ de 30 a 900°C , midiendo el consumo de H_2 de forma continua con un DCT.

3.1.3 Evaluación catalítica en reformado en fase gas del glicerol

3.1.3.1 Sistema de reacción

El comportamiento catalítico de los materiales durante el reformado de glicerol en fase gas fue evaluado en un sistema de reacción compuesto básicamente por vaporizador, reactor y condensador, según muestra esquemáticamente la **Fig. 3.1**. Este sistema consistió en un reactor tubular de cuarzo (1,2 cm D.I. x 40,0 cm longitud), de lecho fijo y operado con flujo continuo descendente, previamente cargado con 500 mg de catalizador, y calefacción proporcionada por un horno eléctrico con controlador-programador de temperatura (2416, Eurotherm) y termocupla tipo K. Previo al reactor, se encuentra conectado un vaporizador de vidrio, el cual fue alimentado con dos corrientes diferentes: una gaseosa, de helio a 15 mL min^{-1} (carrier del sistema) y otra líquida, de solución acuosa de glicerol (50,0% p/v, Cicarelli) a $0,17 \text{ mL min}^{-1}$. La corriente de helio fue alimentada con un controlador de flujo másico (CFM) (GFC171, Aalborg) por la parte superior del vaporizador, permitiendo modificar la presión parcial del sistema. La alimentación líquida fue impulsada por una bomba de jeringa (74900, Cole Parmer) de velocidad controlada, que ingresa al vaporizador por una conexión en diagonal, con tapa roscada y septo, a través de una aguja. El vaporizador se encuentra alojado en un módulo calefaccionado a 200°C mediante resistencia eléctrica, la cual es controlada con un varivolt mecánico (MEI162, Variostat), favoreciendo la vaporización del líquido alimentado al sistema; además, está relleno con vidrio molido para disminuir el volumen muerto y aumentar la superficie de intercambio de calor. Posterior al reactor, se encuentra conectado un condensador de vidrio que permite retener la fracción condensada, y posee un tubo de vidrio graduado con robinete especial en su parte inferior que facilita la medida del volumen condensado y la extracción

periódica de dicha fracción, mientras los gases no condensados eluyen por una salida superior hacia dos válvulas de muestreo en línea que conectan a sendos sistemas de detección y luego hacia un sistema de exhaustión de gases fuera del laboratorio.

Para la operación del sistema, se procedió a cargar el catalizador en el reactor, conectar el vaporizador y condensador al reactor, habilitar la alimentación de helio y controlar todas las conexiones para determinar que no existan pérdidas. Luego, se habilitó el calentamiento del módulo de calefacción del vaporizador y el programa de temperatura utilizado en el reactor, el que consistió en una rampa de calentamiento de $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta la temperatura final de operación, la cual fue mantenida durante todo el tiempo de reacción. El inicio del tiempo de reacción se consideró a partir del momento en que se comenzó a alimentar la solución acuosa de glicerol mediante la bomba de jeringa.

La evaluación de los catalizadores durante la reacción de reformado en fase gas del glicerol fue realizada empleando diferentes condiciones de operación: temperatura de reacción 300, 500 ó 700°C ; presión 0,1 MPa; velocidad espacial masica horaria (VEMH) $10,0 \text{ h}^{-1}$; relación molar carrier:agua:glicerol (RMCAG) 0,7:6:1, (relación molar agua:glicerol, RMAG 6:1) y flujo de alimentación de glicerol (FAG) $0,17 \text{ mL min}^{-1}$, evaluando los resultados obtenidos durante 8 horas de reacción. Todos los catalizadores fueron pretratados *in-situ* (condiciones en sección **3.1.1.4**), observándose en la **Fig. 3.1** los circuitos correspondientes a los gases utilizados en cada etapa y conectados al sistema de reacción.

Las principales variables operativas utilizadas durante el estudio de la reacción fueron previamente seleccionadas considerando en forma complementaria el trabajo de tesina desarrollado en la temática para obtener el título de grado, previo al desarrollo de la beca de doctorado. Las relaciones molares agua:glicerol (RMAG) evaluadas fueron 16:1, 6:1 y 3:1. La relación 16:1 presentó la mayor proporción de agua en solución, lo que permitió lograr una mayor estabilidad durante la reacción y facilitó la evaluación del comportamiento catalítico de los materiales utilizados en reacciones prolongadas. La relación 3:1 fue una condición en la que, debido a la menor cantidad de agua y consecuente mayor concentración de glicerol, favoreció la formación de depósito carbonoso sobre el catalizador durante la reacción con una marcada reducción de la actividad catalítica, siendo utilizada como condición extrema para acelerar los procesos de desactivación y evaluarlos durante la reacción de reformado en fase gas. La relación 6:1 fue seleccionada como

condición estándar para efectuar los ensayos sistemáticos con catalizadores mono y bimetalicos presentados en la tesis doctoral, permitiendo realizar comparaciones entre los comportamientos catalíticos de los mismos. Por tanto, esta condición correspondió a un valor intermedio entre dos condiciones extremas evaluadas. Las diferentes RMAG fueron obtenidas modificando la concentración de la solución acuosa de glicerol preparada para alimentar el sistema de reacción, las cuales fueron 25, 50 y 72% p/v.

El flujo de alimentación de glicerol utilizado fue $0,17 \text{ mL min}^{-1}$, el cual se determinó en base a una búsqueda bibliográfica, seleccionando un valor que fuera adecuado para el proceso continuo de reformado en fase gas y que al mismo tiempo no generara tiempos de residencia demasiado prolongados en el reactor. Una vez seleccionado el flujo de alimentación de la solución de glicerol, fueron ensayadas diferentes velocidades espaciales máxicas horarias (VEMH), las cuales fueron 6,7; 10,0 y $20,0 \text{ h}^{-1}$. Esto se logró modificando la masa de catalizador utilizada en el sistema de reacción (250, 500 y 750 mg), lo que permitió determinar durante el reformado en fase gas de glicerol que la masa óptima de catalizador correspondió a 500 mg, lo que definió a 10 h^{-1} como el valor óptimo de VEMH.

Las presiones parciales del sistema también fueron modificadas, variando el flujo del gas inerte co-alimentado con la solución acuosa de glicerol, y evaluando flujos de 15, 35 y 55 mL min^{-1} de helio, lo cual permitió identificar al menor de ellos como el valor óptimo para la reacción.

Debido a que la temperatura de reacción es un parámetro que interesa evaluar durante la reacción de reformado en fase gas, el rango de temperatura inicialmente seleccionado fue 500-700 °C. Sin embargo, luego también se decidió evaluar el comportamiento a 300 °C para analizar la composición de los productos gaseosos y condensados obtenidos, y particularmente el depósito carbonoso formado sobre el catalizador, siendo un parámetro de referencia para comparar los distintos catalizadores evaluados.

Para asegurar el control químico y determinar la ausencia de control difusional en el sistema de reacción utilizado, fueron realizadas una serie de reacciones catalíticas de reformado en fase gas de glicerol, empleando el catalizador $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (con masas de 250, 500 y 750 mg) y N_2 como gas carrier (con flujos de 20, 40 y 60 mL min^{-1}). Las reacciones fueron llevadas a cabo realizando modificaciones en el flujo de gas carrier alimentado al sistema, así como en la masa de catalizador del lecho del reactor. Esto permitió determinar que los valores obtenidos en dichas

reacciones (9 en total) fueron similares aún modificando las variables del sistema, y permitieron seleccionar las condiciones de trabajo adecuadas que aseguraban la reacción bajo control químico.

3.1.3.2 Seguimiento de la reacción

El análisis de los productos generados y del reactivo consumido durante la reacción fue realizado por cromatografía de gases. La fracción de gases y compuestos no condensados eluyente del sistema de reacción fue analizada al momento de la reacción empleando dos cromatógrafos en paralelo. El primer equipo (GC-2014, Shimadzu) contó con una válvula de muestreo de 6 vías calefaccionada, que permitió inyectar 110 μL de la corriente gaseosa en una columna Carboxen-1006 PLOT (Supelco) de 0,53 mm D.I. x 30 m longitud, la cual fue operada con el programa: 8 min a 40°C, rampa de calentamiento 10°C min^{-1} hasta 100°C, mantenimiento a dicha temperatura durante 8 min. La columna empleó helio como gas carrier con un flujo de 8 mL min^{-1} , y recibió un flujo adicional de helio de 8 mL min^{-1} proveniente del barrido de la válvula de muestreo.

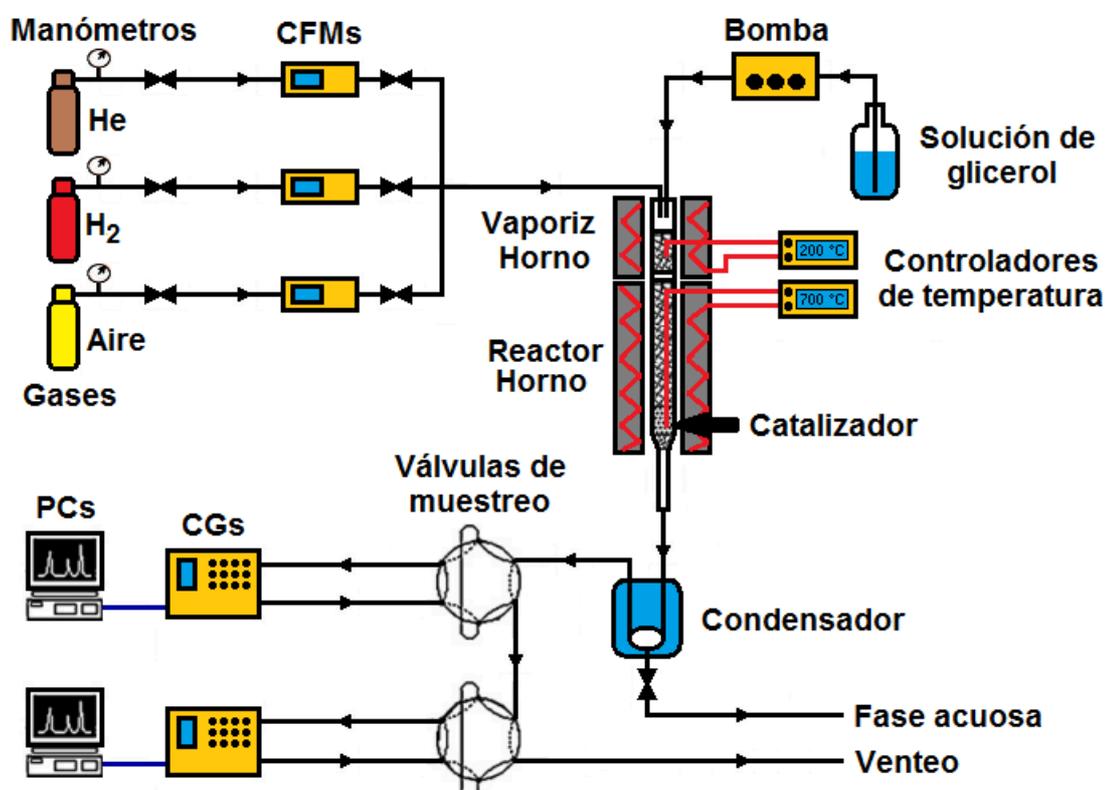


Figura 3.1: Esquema del sistema de análisis utilizado para la evaluación catalítica mediante reformado del glicerol en fase gas.

El detector utilizado fue un TCD, el cual se operó con un flujo de helio en la rama de referencia de 15 mL min^{-1} , y permitió identificar los gases H_2 , CO , CO_2 y CH_4 . El segundo equipo (Star 3400, Varian) también contó con una válvula de muestreo de 6 vías calefaccionada, que permitió inyectar $200 \mu\text{L}$ de la corriente gaseosa en una columna GS-Alúmina (J&W) de $0,53 \text{ mm D.I.} \times 30 \text{ m}$ longitud, operada con el programa: 5 min a 70°C , rampa de calentamiento de 8°C min^{-1} hasta 110°C , rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 185°C , mantenimiento a dicha temperatura por 5 min . La columna empleó N_2 como gas carrier con un flujo de 6 mL min^{-1} , siendo el flujo adicional de N_2 de 40 mL min^{-1} proveniente del barrido de la válvula de muestreo inyectado a un sistema split/splitless. El detector utilizado fue un FID, el cual se operó con un flujo de H_2 de 30 mL min^{-1} y de aire de 240 mL min^{-1} , logrando identificar los gases desde C_1 (metano) a C_6 (hexano). La información suministrada por el TCD fue adquirida mediante PC con un software especial de adquisición de datos, mientras que para el FID se empleó un integrador (CR3A, Shimadzu).

La fracción condensada (muestra colectada cada 1 h) se analizó luego de finalizar la reacción por cromatografía de gases (GC-2014, Shimadzu). Se inyectó $3 \mu\text{L}$ de muestra con una jeringa cromatográfica (Microliter 701 N, Hamilton) en una columna CBP20-S25-050 (Shimadzu) de $0,32 \text{ mm D.I.} \times 25 \text{ m}$ longitud, que fue operada con el programa: 4 min a 35°C , rampa de calentamiento $20^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 200°C , mantenimiento de la temperatura por 20 min , rampa de calentamiento de $20^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 220°C , y mantenimiento de la temperatura por 3 min . Esta columna emplea N_2 como gas carrier con un flujo de $2,25 \text{ mL min}^{-1}$. El detector empleado fue un FID, operado con un flujo de H_2 de 30 mL min^{-1} y de aire de 240 mL min^{-1} , permitiendo identificar los compuestos condensados (disueltos en agua) y el glicerol remanente en las muestras colectadas, así como la cantidad de glicerol alimentada al sistema por inyección directa de la solución de glicerol inicial.

3.1.3.3 Cuantificación de resultados

Los productos gaseosos generados durante el reformado en fase gas fueron cuantificados empleando sendos patrones de gases certificados: para identificación de los compuestos gaseosos livianos (detectados con TCD) se utilizó un patrón de gases especiales conteniendo H_2 , CO , CO_2 y CH_4 , mientras que para identificar los compuestos gaseosos de mayor peso molecular (detectados con FID) se utilizó otro

patrón de gases especiales conteniendo desde C₁ (CH₄) hasta C₆ (hexano). Las concentraciones de compuestos gaseosos fueron calculadas según la ecuación:

$$\frac{C_{inc}}{A_{inc}} = \frac{C_{i\ patr}}{A_{i\ patr}} \quad (3.3)$$

Siendo:

C_{inc}: concentración del compuesto incógnita (moles).

A_{inc}: área del pico cromatográfico del compuesto incógnita.

C_{i patr}: concentración del compuesto "i" en el patrón certificado (moles).

A_{i patr}: área del pico cromatográfico del compuesto "i" en el patrón certificado.

Dado que ambos patrones de gases certificados poseen metano (CH₄), la vinculación entre los dos análisis de la fase gaseosa (obtenidos con DCT y FID) fue realizada mediante interrelación de áreas de CH₄.

La cuantificación de los principales productos líquidos obtenidos en la reacción de reformado, así como el glicerol remanente (sin reaccionar), fue realizada por el Método de Estándar Interno (Skoog y Leary, 1994), empleando una solución de n-butanol (99%, BDH). El método consistió en añadir a la muestra incógnita una cantidad conocida de n-butanol (sustancia diferente a los analitos a determinar y que eluye sin superponerse a ningún compuesto), y comparar la respuesta obtenida mediante cromatografía gaseosa para esta muestra y para soluciones de diferentes concentraciones de cada analito puro con una cantidad conocida de n-butanol.

Los principales compuestos líquidos identificados fueron acetona (Ac), metanal (MeAL), etanal (EtAL), 1,2-etanodiol (1,2-EtDOL), 1,2-propanodiol (1,2-PDOL), 1,3-propanodiol (1,3-PDOL), propenal (PrENAL), 2-hidroxi-etanal (2-HEtAL), 2,3-dihidroxi-propanal (2,3-DHPAL) y monohidroxiacetona (MHA). Para la preparación de las curvas de calibrado, en matraces de 10 mL se procedió a realizar pesada exacta de las masas detalladas en la **Tabla 3.1**, para luego enrasar con agua destilada, obteniendo una solución madre de cada compuesto con concentraciones finales mostradas en la **Tabla 3.1**. La solución de estándar interno se preparó en matraz de 10 mL, pesando una masa exacta de 150 mg de n-butanol, para luego enrasar con agua destilada, obteniendo una concentración final de 15 g L⁻¹. Para construir las curvas para cada compuesto, se realizaron tres diluciones de cada solución madre y la solución madre de n-butanol se diluyó 5 veces. Para ello, en tubos eppendorfs y empleando micropipeta se prepararon las muestras para analizar, adicionando 200 µL de solución de n-butanol (dilución=1/5), luego los

volúmenes para cada compuesto y para cada punto de la curva mostrados en la **Tabla 3.1**, y finalmente se llevó hasta un volumen final de 1 mL.

Tabla 3.1: Masas (g), concentraciones de solución madre, C_{SM} ($g L^{-1}$) y volúmenes de solución madre, V_{SM} (μL) utilizados durante la cuantificación de los compuestos identificados en la fracción líquida de la reacción de reformado en fase gas.

Compuesto (pureza)	Masa (g)	C_{SM} ($g L^{-1}$)	V_{SM} 1 (μL)	V_{SM} 2 (μL)	V_{SM} 3 (μL)
Ac (99,5)	8,00	800	10	20	50
MeAL (35,0)	10,80	1080	10	20	50
EtAL (90,0)	11,00	1100	2	5	10
1,2-EtDOL (90,0)	11,00	1100	1	2	5
1,2-PDOL (99,5)	10,50	1050	2	5	10
1,3-PDOL (98,0)	10,50	1050	2	5	10
PrENAL (99,0)	8,00	800	2	5	10
2-HEtAL (99,0)	8,00	800	2	5	10
2,3-DHPAL (98,0)	14,50	1450	2	5	10
MHA (90,0)	10,80	1080	1	2	5

Para la preparación de la curva de calibrado correspondiente al glicerol remanente, en un matraz de 10 mL se procedió a realizar pesada exacta de la masa de glicerol (5 g), para luego enrasar con agua destilada, obteniendo la solución madre con una concentración final de $500 g L^{-1}$. La solución de estándar interno se preparó de idéntica forma que la descrita anteriormente. Para construir la curva para el glicerol, se realizaron cinco diluciones de la solución madre, mientras que la solución madre de n-butanol se diluyó 5 veces. En tubos eppendorfs y empleando micropipeta, se adicionó 200 μL de la solución de n-butanol ($d=1/5$), luego los volúmenes para cada dilución del glicerol (10, 20, 50, 100 y 150 μL , correspondientes a las diluciones 1/100, 1/50, 1/20, 1/10 y 1/6,67, respectivamente), y finalmente se llevó a volumen final de 1 mL. Para cuantificar las muestras incógnitas en fase líquida, en tubos eppendorfs y empleando micropipeta, se adicionó 200 μL de la solución de n-butanol ($d=1/5$), 500 μL de cada muestra incógnita ($d=1/2$), y finalmente se llevó a volumen final de 1 mL con agua destilada.

Todas las muestras preparadas fueron analizadas por cromatografía de gases (GC-2014, Shimadzu), inyectando 3 μL de cada muestra con jeringa cromatográfica

(Microliter 701 N, Hamilton) en una columna CBP20-S25-050 (Shimadzu), empleando las condiciones operativas descritas en la sección 3.1.3.2. Cada punto de la curva se realizó por triplicado. La curva de calibrado para cada compuesto se construyó graficando la relación entre las áreas de los picos de cada compuesto incógnita y del n-butanol (A_{inc} / A_{EI}) en función de la relación de concentraciones de cada compuesto incógnita y del n-butanol (C_{inc} / C_{EI}), para cada punto de la curva. Finalmente, con la ecuación de la recta fue posible calcular C_{inc} , dado que “y” corresponde a la relación A_{inc}/A_{EI} en la curva de calibrado, mientras que “x” es la relación C_{inc}/C_{EI} , según se observa en la siguiente ecuación:

$$\frac{A_{inc}}{A_{EI}} = A \frac{C_{inc}}{C_{EI}} + B \quad (3.4)$$

siendo:

A_{inc} : área del pico cromatográfico del compuesto incógnita.

A_{EI} : área del pico cromatográfico del Estándar Interno.

C_{inc} : concentración del compuesto incógnita (g L^{-1}).

C_{EI} : concentración del Estándar Interno (g L^{-1}).

A: pendiente de la curva de calibrado.

B: ordenada al origen de la curva de calibrado.

Luego, conociendo las concentraciones de cada compuesto en la fase acuosa y los volúmenes de cada fracción líquida recuperados durante la reacción, fue posible calcular los moles obtenidos para cada compuesto en dicha fracción.

3.1.3.4 Cálculo de parámetros

Los parámetros utilizados para evaluar el desempeño de los catalizadores durante el reformado en fase gas del glicerol fueron: conversión total de glicerol (X_T), conversión de glicerol en productos gaseosos (X_G), conversión de glicerol en productos líquidos (X_L), relación de gas de síntesis (R_{GS}), selectividades a H_2 (S_{H_2}) y a productos que contienen C (S_C), y rendimientos a H_2 (Y_{H_2}) y a productos que contienen C (Y_C).

La X_T (Dieuzeide y col., 2012) fue calculada a partir de los moles de glicerol alimentado y de glicerol eluyente del sistema de reacción, dado por:

$$X_T(\%) = \frac{n_{\text{gli,c}}}{n_{\text{gli,e}}} \times 100 \quad (3.5)$$

$$n_{\text{gli,c}} = n_{\text{gli,e}} - n_{\text{gli,s}} \quad (3.6)$$

siendo:

$n_{\text{gli,c}}$: moles de glicerol consumidos en la reacción (mol).

$n_{\text{gli,e}}$: moles de glicerol alimentados al sistema de reacción (mol).

$n_{\text{gli,s}}$: moles de glicerol eluyentes del sistema de reacción (mol).

La X_G (Pompeo y col., 2012) fue obtenida a partir de los moles de los principales compuestos gaseosos obtenidos y los moles de glicerol alimentados durante la reacción, según:

$$X_G(\%) = \frac{\sum n_{i,G}}{3 n_{\text{gli,e}}} \times 100 \quad (3.7)$$

siendo:

$n_{i,G}$: moles del compuesto gaseoso "i" eluyente del sistema de reacción (mol).

$n_{\text{gli,e}}$: moles de glicerol alimentados al sistema de reacción (mol).

La X_L (Pompeo y col., 2012) se definió a partir de los moles de glicerol alimentado y eluyente del sistema de reacción, junto con la conversión de glicerol en productos gaseosos, según:

$$X_L(\%) = \left(\frac{n_{\text{gli,c}}}{n_{\text{gli,e}}} \times 100 \right) - X_G \quad (3.8)$$

siendo:

$n_{\text{gli,c}}$: moles de glicerol consumidos en la reacción (mol).

$n_{\text{gli,e}}$: moles de glicerol alimentados al sistema de reacción (mol).

X_G : conversión de glicerol en productos gaseosos (adimensional).

Para evaluar el ajuste entre la cantidad de productos generados durante la reacción y los reactivos alimentados se desarrolló un balance de masa considerando los compuestos a la entrada y a la salida del sistema de reacción. Para la entrada, se consideró los reactivos glicerol y agua, calculando los moles individuales de C, H y O que fueron alimentados al sistema, a partir del flujo seleccionado de la solución acuosa de glicerol, corroborado con la lectura de volumen exacto inyectado mediante bomba de pistón durante el tiempo total de operación y la pesada de reactivos para asegurar la concentración seleccionada de solución acuosa de glicerol. Respecto a la salida, fueron calculados los moles finales de C, H y O obtenidos para los compuestos gaseosos (no condensables) y

líquidos (condensables), junto con los moles de C correspondientes al depósito carbonoso formado, para el cual no se cerró el balance de H y O. Para realizar estos cálculos, se procedió; *i*) para los compuestos gaseosos se midió en forma periódica el flujo de gas eluyente del sistema de reacción (suma de gas carrier, alimentado con controlador de flujo másico, más el aporte de los productos no condensados) utilizando un caudalímetro calibrado, siendo la composición molar determinada con los análisis en línea con DCT y FID citados en Materiales y Métodos; *ii*) para los compuestos líquidos se midió el volumen condensado (agua y productos de reacción) durante períodos de 1 hora, hasta completar el tiempo total de reacción, empleando la bureta especialmente adaptada para tal determinación, siendo la composición molar determinada con los análisis con FID y las curvas de calibrado citadas en Materiales y Métodos; y *iii*) para el depósito carbonoso se cuantificó el porcentaje de C según lo descrito en Materiales y Métodos, conociéndose además la masa de catalizador empleada. La diferencia entre entrada y salida para cada uno de los elementos analizados permitió cerrar el balance de átomos de C e H con un error inferior a 10%, mientras que para el balance de átomos de O fue menor a 6%. Los cálculos fueron realizados para los distintos catalizadores evaluados en la reacción a 8 h y permitió determinar que el aporte correspondiente al depósito carbonoso formado sobre el material para el mayor contenido de C determinado (catalizador con $31 \text{ mg C gcat}^{-1} \text{ h}^{-1}$) representó sólo 1% del glicerol alimentado, por lo que se pudo considerar que este aporte tiene incidencia menor (bastante baja o despreciable), aunque no se lo descarta por cuanto se dispone de la cuantificación del depósito carbonoso.

La R_{GS} fue calculada mediante la relación entre las moles de H_2 y CO obtenidos durante la reacción, según:

$$R_{GS} = \frac{n_{H_2}}{n_{CO}} \quad (3.9)$$

siendo:

n_{H_2} : moles de H_2 eluyentes del sistema de reacción (moles).

n_{CO} : moles de CO eluyentes del sistema de reacción (moles).

La S_{H_2} fue calculada a partir de los moles de H_2 generados y los moles de glicerol consumidos, según:

$$S_{H_2}(\%) = \frac{m_{H_2} n_{H_2}}{m_{gli} n_{gli,c}} \times 100 \quad (3.10)$$

siendo:

n_{H_2} : moles de H_2 eluyentes del sistema de reacción (moles).

m_{H_2} : número de átomos de hidrógeno presentes en el H_2 .

$n_{gli,c}$: moles de glicerol consumidos en la reacción (moles).

m_{gli} : número de átomos de hidrógeno presentes en el glicerol.

La S_C fue calculada a partir de los moles de compuestos con carbono generados y los moles de glicerol consumidos, según:

$$S_C(\%) = \frac{m_C n_C}{m_{gli} n_{gli,c}} \times 100 \quad (3.11)$$

siendo:

n_C : moles de compuesto con carbono "C" eluyente del sistema de reacción (moles).

m_C : número de átomos de carbono presentes en el compuesto con carbono "C".

$n_{gli,c}$: moles de glicerol consumidos en la reacción (moles).

m_{gli} : número de átomos de carbono presentes en el glicerol.

El Y_{H_2} fue calculado a partir de los moles de H_2 generados y los moles de glicerol alimentados:

$$Y_{H_2}(\%) = \frac{m_{H_2} n_{H_2}}{m_{gli} n_{gli,e}} \times 100 \quad (3.12)$$

siendo:

n_{H_2} : moles de H_2 eluyentes del sistema de reacción (moles).

m_{H_2} : número de átomos de hidrógeno presentes en el H_2 .

$n_{gli,e}$: moles de glicerol alimentados en la reacción (moles).

m_{gli} : número de átomos de hidrógeno presentes en el glicerol.

El Y_C fue calculado a partir de los moles de compuestos con carbono generados y los moles de glicerol alimentados, según:

$$Y_C(\%) = \frac{m_C n_C}{m_{gli} n_{gli,e}} \times 100 \quad (3.13)$$

siendo:

n_C : moles de compuesto con carbono "C" eluyente del sistema de reacción (moles).

m_C : número de átomos de carbono presentes en el compuesto con carbono "C".

$n_{gli,e}$: moles de glicerol alimentados en la reacción (moles).

m_{gli} : número de átomos de carbono presentes en el glicerol.

Las ecuaciones 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14 fueron establecidas según el material reportado en un trabajo de investigación (Kamonsuangkasem y col, 2013).

3.1.4 Evaluación catalítica durante actividad prolongada

3.1.4.1 Etapas de desactivación

El comportamiento catalítico del material 5Ni/Al₂O₃ durante el reformado en fase gas del glicerol en ensayos de tiempo prolongado se evaluó en el mismo sistema de reacción descrito en la sección 3.1.3.1, efectuando el pretratamiento correspondiente a los materiales de níquel y empleando 500 mg de catalizador. Para el estudio de la desactivación del catalizador, se alimentó al vaporizador una corriente de helio de 15 mL min⁻¹ (carrier del sistema) y una solución acuosa de glicerol a 0,17 mL min⁻¹ (72,0% p/v, Cicarelli), principal característica que permitió acelerar el proceso de desactivación. El vaporizador fue calefaccionado a 200 °C, mientras que el reactor de reformado fue operado a 700 °C; presión 0,1 MPa; VEMH 14,4 h⁻¹, RMCAG 0,5:3:1 (RMAG 3:1), realizando etapas de 12 h cada una.

Para este análisis, fueron realizadas tres experiencias en iguales condiciones operativas. La primera correspondió a la evaluación de una única etapa de 12 h (ciclo de reacción), y se realizó utilizando una solución acuosa de glicerol puro (GP) (P.A., 99,5%) y otra de glicerol crudo (GC) (proveniente de una planta productora de biodiesel, sin efectuar pretratamiento previo), de forma de lograr comparar el comportamiento con ambos reactivos. La segunda experiencia correspondió a dos ciclos de reacción (24 h) y una regeneración intermedia entre ciclos de reacción, mientras la tercera abarcó cuatro ciclos de reacción (48 h) y tres regeneraciones intermedias (entre ciclos de reacción); estas experiencias se realizaron alimentando una solución de GP.

3.1.4.2 Ensayos de regeneración

Luego de cada ciclo de desactivación, se realizó una etapa de regeneración, empleando el sistema descrito en la sección 3.1.3.1, y alimentando una corriente de 50% v/v de aire en He por el ingreso superior del vaporizador, con un flujo de 120 mL min⁻¹. El sistema fue operado con un programa de temperatura, iniciando desde 30 °C, con una rampa de calentamiento de 4 °C min⁻¹ hasta 760 °C (182,5 min), y manteniendo luego dicha temperatura durante 12 h.

3.1.4.3 Cuantificación de resultados

El análisis de los productos generados y reactivos consumidos durante la reacción de desactivación fue realizado por cromatografía de gases, empleando los mismos equipamientos, columnas y técnicas descritas en la sección 3.1.3.2.

El análisis del consumo de O_2 durante el tratamiento de regeneración se evaluó por cromatografía de gases, empleando cromatógrafo (Star 3400, Varian) con una válvula de muestreo de 6 vías calefaccionada, que permitió inyectar 200 μL de la corriente gaseosa en una columna de acero inoxidable rellena con tamiz molecular 13X, mesh 80/100 (CRS) de 1,6 mm D.I. x 1,8 m longitud, operada isotérmicamente a 30°C. La columna empleó He como gas carrier, con un flujo de 15 mL min^{-1} , que primero atravesó la rama de referencia del detector TCD, llegó hasta la válvula de muestreo para arrastrar la muestra inyectada, circuló por la columna y finalmente atravesó la rama de identificación de la muestra. La información suministrada por el TCD fue adquirida mediante PC con software especial de adquisición de datos.

3.1.4.4 Cálculo de parámetros

Los parámetros utilizados para evaluar el desempeño del catalizador $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ durante el reformado en fase gas del glicerol en la reacción de desactivación fueron los mismos que aquellos descritos en la sección 3.1.3.4. La concentración del O_2 consumida (detectada con TCD) durante el tratamiento de regeneración se realizó utilizando un patrón de aire, y calculando la relación entre las áreas obtenidas entre muestra (área bajo la curva del perfil obtenido en el tiempo de regeneración) y patrón, afectando luego por la concentración de O_2 en dicho patrón.

3.1.5 Análisis del depósito carbonoso generado

3.1.5.1 Oxidación a temperatura programada (OTP)

El depósito carbonoso formado sobre el material durante el reformado en fase gas del glicerol fue caracterizado empleando un equipo de OTP. El sistema consiste en dos reactores en serie. El primero, cargado con 10 mg de la muestra a analizar, se alimentó con una corriente de 6% v/v de O_2 en He a 40 mL min^{-1} empleando un CFM (GFC17, Aalborg), y se operó con un programa de temperatura que inició en 30°C, con una rampa de calentamiento de 12°C min^{-1} hasta 760°C, y

manteniendo luego dicha temperatura durante 20 min. El segundo reactor, cargado con 500 mg de Ni-Raney, fue operado isotérmico a 400°C y alimentado con la corriente proveniente del primer reactor, adicionando una corriente de H₂ (22 mL min⁻¹) mediante otro CFM (GFC171, Aalborg). Antes de realizar las experiencias, las muestras fueron secadas en estufa a 110°C durante 24 h. Ambos catalizadores fueron cargados en idénticos reactores tubulares de cuarzo (0,6 cm D.I. x 24,0 cm longitud), soportando el material sobre un lecho de lana de cuarzo, el cual fue reemplazado entre muestras diferentes para evitar contaminaciones cruzadas. El sistema fue operado con flujo continuo descendente y calefacción proporcionada por sendos hornos eléctricos con controlador-programador de temperatura (N2000, Novus) y termocupla tipo K (Omega).

En el primer reactor se produce la oxidación del depósito carbonoso presente en el catalizador corrido ($C + O_2 \rightarrow CO_2$; $2C + O_2 \rightarrow 2CO$), y en el segundo reactor se produce la hidrogenación de la corriente proveniente del primer reactor ($CO_2 + 2H_2 \rightarrow CH_4 + O_2$; $2CO + 4H_2 \rightarrow 2CH_4 + O_2$), es decir la metanación de los óxidos de carbono producidos en la combustión del depósito carbonoso. La generación de metano fue medida de forma continua utilizando un FID, conectado a una computadora con un software de adquisición de datos.

Finalmente, se procedió a calcular la cantidad de depósito carbonoso generado durante la reacción. Debido a que por cada mol de depósito carbonoso eliminado desde el catalizador corrido se produce un mol de metano, todo el metano detectado con FID correspondió a la cantidad de carbón eliminada desde el material. La integración del área bajo la curva de la cantidad de CH₄ generada permitió obtener la cantidad de CH₄ generado durante la OTP, siendo cuantificada mediante un patrón de gases certificados que posee H₂, CO, CO₂ y CH₄, dado que los restantes compuestos del patrón no son identificados en FID por las características propias del detector.

3.2 Sistemas biológicos

3.2.1 Cepas bacterianas

3.2.1.1 Características de las cepas

Los microorganismos empleados durante los ensayos biológicos fueron dos cepas de *Escherichia coli* modificadas. Una de ellas fue una cepa *E. coli* BW25113 frdC (lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔvaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78} / ΔfrdC Ω Km^R) que carece de actividad fumarato reductasa por inactivación de la subunidad frdC de dicha enzima. La restante fue una cepa denominada *E. coli* HW2, que fue obtenida desde la anterior y posee una capacidad mejorada hacia la producción de H₂ a partir de glicerol (Hu y Wood, 2010).

En este trabajo, la cepa *E. coli* BW25113 frdC se empleó como control en los ensayos y se la indica como C_{CON}. La cepa restante, buena productora de H₂, se indica como C_{HW2}. Ambas cepas fueron cedidas gentilmente por el profesor Thomas K. Wood, de la Universidad de Texas A&M, EUA.

3.2.1.2 Mantenimiento de las cepas

Las cepas fueron recibidas en placas de Petri debidamente acondicionadas. Una colonia aislada de cada cepa (C_{CON} y C_{HW2}), fue transferida hacia nuevas placas de Petri preparadas con medio de cultivo LB. La formulación de este medio se detalla en la **Tabla 3.2** (Miller, 1972) y fue suplementado además con 2% p/v agar-agar (Britania) y sulfato de kanamicina 50 μg mL⁻¹. Luego de inoculadas, las placas fueron incubadas a 32 ± 2°C durante 24 h. Salvo indicación específica, esta fue la condición de incubación empleada para los cultivos.

A partir de cada nueva placa, se tomaron colonias aisladas con las que se sembraron tubos en estría preparados con medio de cultivo LB, suplementado como se mencionó previamente. Una vez desarrollados los cultivos en estos tubos, se transfirieron alícuotas a tubos preparados con 3 mL de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico. Alícuotas de 0,5 mL de estos cultivos desarrollados, fueron transferidos a tubos Eppendorf. En estos se agregó, además, 0,5 mL de una solución de glicerol al 50% v/v (99,5%, Cicarelli) y se agitaron mediante vortex. Estos tubos se depositaron en ultrafreezer (Forma 900, Thermo) a -80°C, como conservados, hasta su empleo en los ensayos.

Todas las actividades que implicaron el trabajo con microorganismos se realizaron en condiciones de buenas prácticas microbiológicas. En estas se incluyó el trabajo en cabina de seguridad biológica (Bio II A, Telstar) y la adecuada esterilización del material, previo y posterior a su empleo, según protocolos institucionales.

Tabla 3.2: Componentes del medio de cultivo LB (*Lisogenic Broth*).

#	Componente	Marca	Concentración (g L ⁻¹)
1	EL	Britania	5,0
2	TT*	Britania	10,0
3	NaCl	Atanor	10,0

3.2.2 Diseño experimental

El desarrollo de un diseño experimental se realizó con el objetivo de encontrar los valores óptimos de los componentes del cultivo, que permitan maximizar la producción de H₂ y el consumo de glicerol, minimizando la cantidad de biomasa generada. Los datos colectados durante los ensayos fueron transferidos a una PC Intel Celeron D para su posterior interpretación, mientras que se empleó el programa Design Expert™ versión 8.05.0 (Stat-Ease, Minneapolis, EUA, 2010) para realizar los diseños.

3.2.3 Ensayos de asimilación de glicerol y producción de H₂

3.2.3.1 Sistemas de fermentación

La caracterización de las cepas de *E. coli* y el diseño optimizado de medios de cultivo fueron realizados en cultivos *batch*. Para esto se emplearon frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidad especialmente adaptados, cargados con 200 mL de cultivo. Un esquema de estos frascos se muestra en la **Figura 3.2**.

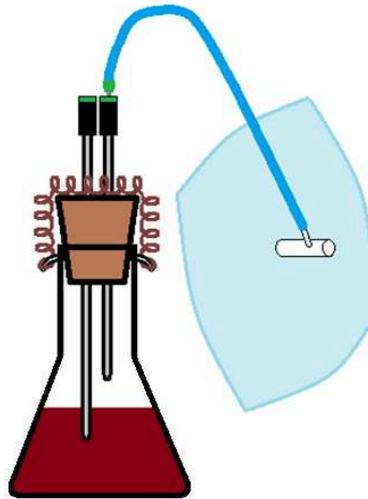


Figura 3.2: Esquema del sistema de fermentación utilizado para la caracterización de las cepas y el diseño de medios de cultivo.

Como puede observarse en la figura, el frasco se cerró con un tapón de goma bi-horadado que poseía dos puertos metálicos para permitir la operación anaeróbica y posibilitar el seguimiento de los cultivos. Tales puertos presentaron en su extremo superior sendos septos de silicona de alta resistencia mecánica y térmica. El tapón de goma fue mantenido en su posición y asegurado al cuello del Erlenmeyer con un resorte de acero inoxidable, para evitar que la presión de los gases producidos durante el cultivo expulse el tapón hacia afuera con la consecuente diseminación de los microorganismos hacia el ambiente, pérdida de los gases productos de la fermentación, entre otros inconvenientes.

La inoculación de cada medio se realizó previo a la carga del cultivo en los frascos Erlenmeyer. Una vez dispuestos los cultivos en los frascos, se procedió a la purga de los gases del aire contenidos en el dispositivo. Para esto se empleó una bomba de vacío conectada a una manguera con una aguja en su extremo, con la que se perforó el septo del puerto más corto (no sumergido en el líquido). El puerto restante (sumergido) se empleó para inyectar gas inerte (He), mediante una garrafa portátil presurizada. Esta garrafa se conectó al puerto con una manguera equipada con un filtro hidrofóbico esterilizante y una aguja con la que se perforó el septo correspondiente. La maniobra de purga se realizó durante 3 minutos, a un flujo de 50 mL min^{-1} y $0,5 \text{ MPa}$. Posteriormente, se cerró el ingreso de gas y se desconectaron la bomba y la garrafa, y se procedió a conectar inmediatamente una bolsa toma-muestras (Tedlar, Keika Ventures) para la recolección de los gases. Ésta, a la que previamente se le efectuó vacío, se anexionó al puerto más corto. El puerto sumergido se utilizó para tomar muestras líquidas.

Además, se realizó un cultivo en un biorreactor de tanque agitado instrumentado de 2 L de capacidad (Biostat A plus, Sartorius). Un esquema del dispositivo se muestra en la **Figura 3.3**.

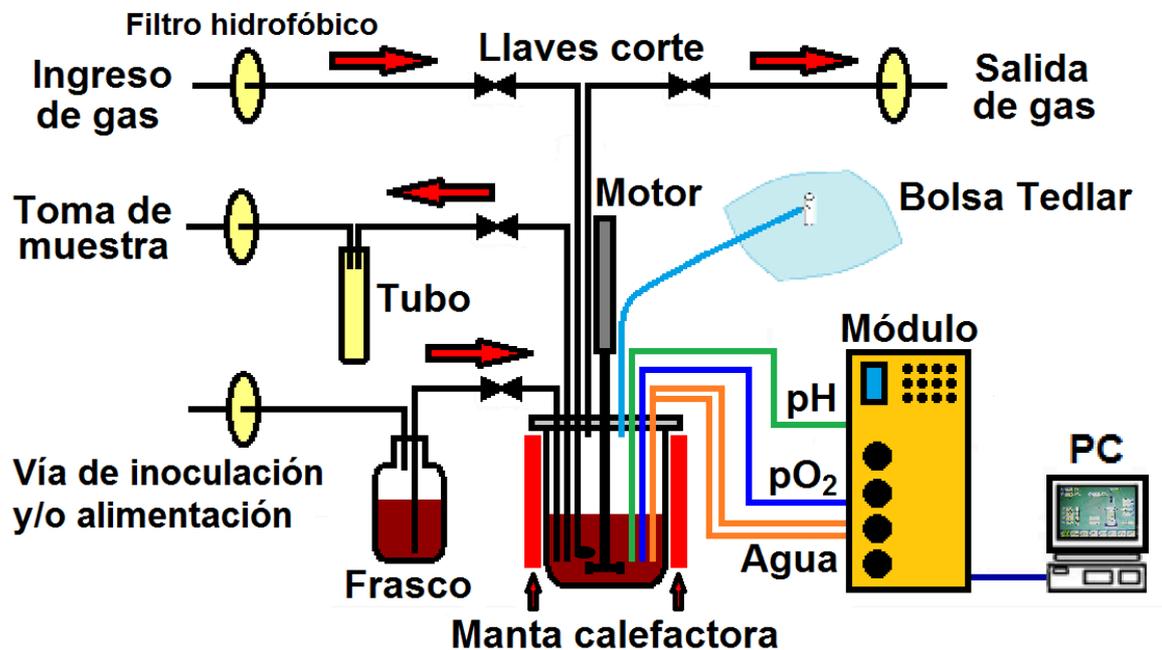


Figura 3.3: Esquema del biorreactor empleado.

Los puntos de ingreso o egreso al biorreactor fueron conectados mediante mangueras de silicona con filtros hidrofóbicos esterilizantes. Además, las mangueras se mantuvieron cerradas con llaves de corte, para impedir el contacto con el exterior durante la operación, siendo abiertas solo en las maniobras específicas. El punto de ingreso del inóculo y soluciones de alimentación fue conectado en su parte intermedia a un frasco de vidrio cerrado, donde se colocó el líquido (inóculo o solución de alimentación) a ser incorporado al sistema. El punto de toma de muestra fue conectado en su parte intermedia a un tubo de plástico cerrado, lugar donde se colectaba la muestra. Tanto el ingreso de inóculo y soluciones como la toma de muestra fueron realizadas por desplazamiento de líquido con gas He. El purgado de los gases del aire (introducidos durante el enfriamiento luego de la esterilización del biorreactor) se realizó de manera similar a la descrita para los frascos Erlenmeyer. Para esto se empleó el burbujeador desde el que se inyectó He.

Las condiciones de operación del biorreactor durante el cultivo se indican más adelante.

3.2.3.2 Medios de cultivo

Para verificar la calidad de las cepas recibidas y el comportamiento durante el proceso fermentativo, las mismas fueron primeramente analizadas empleando una formulación de medio de cultivo idéntica a la reportada por los autores que modificaron la cepa. Este medio fue denominado M1, y sus componentes son detallados en la **Tabla 3.3** (Hu y Wood, 2010). Los componentes con baja concentración fueron diluidos a partir de una solución madre concentrada.

Posteriormente, se evaluó el comportamiento fermentativo de ambas cepas en dos medios de cultivo diferentes, los cuales poseen menores requerimientos que los utilizados en la preparación del medio M1. La segunda formulación se caracterizó por ser relativamente simple, debido a que posee diferentes sales, junto con una fuente que aporta carbono y nitrógeno. Este medio fue denominado M2, y sus componentes son mostrados en la **Tabla 3.4** (Cofré y col., 2012). La última de las formulaciones correspondió a un medio con mayores aportes de fuentes de nutrientes esenciales, desarrollado para la producción de una proteína recombinante modelo en *E. coli*. Este medio fue denominado M3, y sus componentes son detallados en la **Tabla 3.5** (Giordano y col., 2010).

Para el medio M1, luego de disolver el MOPS el pH se ajustó a 7,4 con H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, y luego de disolver el glicerol el pH final se ajustó a 6,3 con H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$. Para el caso de los medios M2 y M3, luego de agregar el glicerol el pH fue llevado a 6,3 mediante agregado de NaOH 1 mol L^{-1} o H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, según corresponda. El ajuste de pH se realizó con un peachímetro digital (WTW, Inolab).

Tabla 3.3: Componentes del medio de cultivo M1 (Hu y Wood, 2010).

#	Componente	Marca	Concentración (g L ⁻¹)
1	MOPS	US Biological	11,56
2	Tricina	Sigma	0,72
3	FeSO ₄	Cicarelli	1,52 x 10 ⁻³
4	NH ₄ Cl	Merck	0,51
5	K ₂ SO ₄	Merck	0,05
6	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cicarelli	7,35 x 10 ⁻⁵
7	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cicarelli	0,11
8	NaCl	Cicarelli	0,29
9	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	Cicarelli	3,71 x 10 ⁻⁶
10	H ₃ BO ₃	Cicarelli	2,47 x 10 ⁻⁵
11	CoCl ₂ ·6H ₂ O	Cicarelli	7,14 x 10 ⁻⁶
12	CuSO ₄	Hindal	1,60 x 10 ⁻⁶
13	MnCl ₂ ·4H ₂ O	Biopack	1,58 x 10 ⁻⁵
14	ZnSO ₄	Hindal	1,62 x 10 ⁻⁶
15	Na ₂ HPO ₄	Wisconsin	0,19
16	Na ₂ SeO ₃	Sigma	8,65 x 10 ⁻⁴
17	TT	Britania	2,00
18	Glicerol	Cicarelli	10,00

Tabla 3.4: Componentes del medio de cultivo M2 (Cofré y col, 2012).

#	Componente	Marca	Concentración (g L ⁻¹)
1	Na ₂ SO ₄	Carlo Erba	8,06 x 10 ⁻²
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Carlo Erba	3,10 x 10 ⁻²
3	NaCl	Atanor	1,52 x 10 ⁻²
4	TT	Britania	4,25
5	Glicerol	Cicarelli	10,00

Tabla 3.5: Componentes del medio de cultivo M3 (Giordano y col., 2010).

#	Componente	Marca	Concentración (g L ⁻¹)
1	NaCl	Atanor	1,00
2	EL	Britania	27,50
3	TT	Britania	30,00
4	Glicerol	Cicarelli	1,40

Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos o 25 minutos, según correspondan a volúmenes inferiores o superiores a 200 mL, respectivamente.

3.2.3.3 Preparación del inóculo y condiciones de cultivo

Para la preparación del inóculo se procedió a descongelar uno de los conservados de cada cepa almacenados a -80°C. Una alícuota de cada cepa fue transferida a tubos con 5 mL con medio de cultivo LB, suplementado con el antibiótico. Luego del desarrollo de estos cultivos, se procedió a realizar un repique en sendas placas de Petri con medio LB suplementado con agar-agar y antibiótico. Una vez desarrollados estos cultivos, se utilizó una colonia aislada para inocular sendos frascos Erlenmeyer que contenían 25 mL de medio LB estéril, suplementado con el antibiótico. Los cultivos así obtenidos se emplearon como inóculo en los ensayos.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración inicial de glicerol en la formulación del medio de cultivo M3, se decidió explorar un rango de concentraciones de esta fuente de carbono, donde la producción de H₂ fuese mayor y la de biomasa sea minimizada. Para ello se cultivó la cepa C_{HW2} en 6 diferentes medios de cultivo, conteniendo concentraciones constantes de TT, EL y NaCl (reportadas en la **Tabla 3.5**) y variables de glicerol (0,50; 1,40; 3,00; 6,00; 10,00 y 15,00 gL⁻¹). Este ensayo se realizó en frascos Erlenmeyer.

Con el objetivo de reoptimizar el medio de cultivo M3 para las condiciones de este trabajo con la cepa C_{HW2}, se planteó un DCC fraccionado. Para cada componente del medio, se definió un valor central, y un valor equidistante por encima y por debajo del valor central, obteniéndose 30 combinaciones sugeridas de concentraciones entre TT, EL, NaCl y glicerol. El ensayo se realizó en frascos

Erlenmeyer y los detalles de las combinaciones realizadas para cada formulación se muestran en el capítulo Resultados y Discusión.

Finalmente, con el objetivo de escalar las situaciones optimizadas, se realizó un cultivo de 1L en el biorreactor con la cepa C_{HW2} . El cultivo se realizó a una velocidad de agitación de $100,0 \pm 0,6$ rpm y a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ de temperatura.

Durante cada ensayo se tomaron muestras periódicas, tanto líquidas como gaseosas. Para estas últimas, se reemplazó la bolsa toma-muestra Tedlar cargada con gases por una nueva. La frecuencia de los muestreos se puede observar con los resultados de cada ensayo en el capítulo Resultados y Discusión. En las muestras se realizaron las determinaciones que se indican a continuación.

3.2.4 Determinaciones analíticas

3.2.4.1 Cuantificación de biomasa

Una alícuota de cada muestra líquida colectada durante los distintos ensayos fue empleada para determinar la concentración de biomasa por lectura de absorbancia a 600 nm (DO_{600}) en espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb). Las alícuotas se diluyeron convenientemente, empleando agua destilada, cuando las DO_{600} superaban las 0,5 unidades de absorbancia.

Para obtener una relación directa entre la DO_{600} y la concentración de biomasa seca, se utilizó un volumen exacto de un cultivo de DO_{600} conocida. Esta alícuota se centrifugó ($5000 \times g$, 10 minutos) descartando cuidadosamente el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en agua destilada, y se repitió la centrifugación. Este lavado con agua de la biomasa se realizó una vez más. La biomasa así procesada fue nuevamente resuspendida en agua destilada y transferida a cápsulas previamente taradas. El conjunto se incubó en estufa a $50 \pm 1^\circ\text{C}$. La biomasa se cuantificó gravimétricamente, hasta obtener un valor constante, estableciendo la relación entre DO_{600} y la concentración de biomasa.

3.2.4.2 Cuantificación de glicerol en las muestras líquidas

A partir de las muestras líquidas recolectadas de los ensayos, se trasvasaron 2 mL de cada una de ellas a tubos Eppendorf, para luego centrifugarlas a $6574 \times g$ durante 5 minutos y separar la biomasa del sobrenadante. Ésta última fracción fue

conservada en freezer a -20°C hasta el momento de su utilización en las determinaciones analíticas, previo descongelado.

Para la valoración del glicerol remanente en los cultivos, se adaptó un kit comercial colorimétrico-enzimático, desarrollado para determinación de triglicéridos en suero o plasma humano (TG Liquid Plus, GT Lab). La cuantificación de glicerol en las muestras se realizó empleando curvas de calibrado construidas con testigos de glicerol de concentración conocida: 0,3; 0,6 y $1,0\text{ g L}^{-1}$. Cada muestra fue valorada por duplicado. El protocolo de la técnica se detalla en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Protocolo utilizado para la determinación del glicerol en las muestras líquidas.

Procedimiento	Rótulo del tubo	
	Blanco	Muestra
Adición de muestra	-	10 μL
Adición de H_2O_d	10 μL	-
Adición de reactivo (provisto por el kit)	1 mL	1 mL
Incubación a 37°C durante 5 minutos en un baño termostatzado.		
Lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 550 nm (SP-1102, SFI).		

3.2.4.3 Cuantificación de analitos en la fracción gaseosa

Todas las muestras colectadas en bolsas Tedlar se analizaron empleando un cromatógrafo de gases (GC-2014, Shimadzu), que cuenta con una válvula de muestreo de 6 vías calefaccionada, que permitió inyectar $110\text{ }\mu\text{L}$ de la muestra presente en la bolsa en una columna Carboxen-1006 PLOT (Supelco) de $0,53\text{ mm D.I.} \times 30\text{ m}$ longitud. Las condiciones de operación del equipo y los procedimientos realizados fueron previamente descritos en la sección 3.1.3.2. El detector utilizado fue un TCD, el cual se operó con un flujo de helio de 15 mL min^{-1} , y permitió identificar los gases producidos durante el cultivo. La cuantificación de la composición total de productos en la muestra gaseosa fue realizada mediante un patrón de gas certificado, según fue indicado en la sección 3.1.3.3.

3.2.5 Cálculo de parámetros de cultivo

3.2.5.1 Parámetros cinéticos

Los principales parámetros cinéticos empleados en la caracterización de los cultivos ensayados fueron la velocidad específica de crecimiento (μ), el consumo de glicerol (Q_{gli}) y la productividad de H_2 (PV_{H_2}).

La velocidad específica de crecimiento de cada cultivo se determinó a partir de las gráficas semilogarítmicas de concentración de biomasa (X) en función del tiempo de cultivo (t) (Carrillo, 2003). El arreglo gráfico de estos datos, para la fase de crecimiento exponencial, corresponden a una recta, cuya ecuación está representada en la siguiente ecuación:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (3.14)$$

En la ecuación, X_0 corresponde a la concentración de biomasa al momento de iniciarse la fase exponencial. La pendiente de la recta de regresión corresponde directamente al valor de μ .

El consumo de glicerol fue calculado aplicando la Ecuación 3.16:

$$Q_{gli} = \frac{|\Delta C_{gli}|}{\Delta t} \quad (3.15)$$

En esta ecuación, ΔC_{gli} corresponde a la diferencia de concentración de glicerol entre los tiempos del intervalo Δt del ensayo.

La productividad de H_2 fue determinada aplicando la Ecuación 3.17:

$$PV_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{V_R \times t} = \quad (3.16)$$

En esta ecuación, n_{H_2} corresponde al número de moles de H_2 acumulados durante un lapso de muestreo (t) y V_R al volumen de cultivo en el biorreactor.

3.2.5.2 Parámetros estequiométricos

Los parámetros estequiométricos utilizados para la caracterización de los cultivos fueron la densidad celular máxima (X_{max}), la producción acumulada de H_2

(P_{H_2}) y los rendimientos específicos de biomasa respecto a sustrato ($Y_{X/G}$), de H_2 respecto a biomasa ($Y_{H_2/X}$) y de H_2 respecto a sustrato ($Y_{H_2/G}$).

La X_{max} correspondió al máximo valor de concentración celular hallado en cada sistema de cultivo.

La P_{H_2} correspondió al número de moles de H_2 acumulados (n_{H_2}) durante un lapso de muestreo (t).

El rendimiento específico de biomasa respecto a sustrato fue definido por la relación entre la concentración de biomasa generada durante el ensayo ($\Delta X = X_{max} - X_0$) y la diferencia de las concentraciones de glicerol correspondientes a los momentos en que ocurrían tales valores de biomasa. Esto se representa en la Ecuación 3.18:

$$Y_{X/G} = \frac{\Delta X}{|\Delta C_{gli}|} \quad (3.17)$$

El rendimiento específico de H_2 respecto a biomasa se calculó a partir de la relación entre la concentración de H_2 producido (C_{H_2}) y la de biomasa generada, según se muestra en la Ecuación 3.19:

$$Y_{H_2/X} = \frac{C_{H_2}}{\Delta X} \quad (3.18)$$

De manera similar, el rendimiento específico de H_2 producido respecto al sustrato glicerol consumido fue determinado empleando la Ecuación 3.20.

$$Y_{H_2/G} = \frac{C_{H_2}}{|\Delta C_{gli}|} \quad (3.19)$$

En todos los casos, la concentración de H_2 al momento de la inoculación fue nula.

Capítulo 4



Resultados y Discusión

4.1 Procesos catalíticos

4.1.1 Caracterización físicoquímica de materiales

4.1.1.1 Espectroscopía de Emisión Óptica por Plasma Inductivo

La composición real de los metales impregnados, obtenida a partir del análisis elemental de los materiales preparados con el elemento base o los promotores empleados, son presentados en la **Tabla 4.1**. En la mayoría de los catalizadores preparados, la carga real impregnada de níquel (Ni), Cobalto (Co) o Cerio (Ce) fue levemente superior al valor teórico calculado, con un error relativo porcentual no mayor al 5%, lo cual indicó que los cálculos teóricos fueron aceptables.

Tabla 4.1: Composición real de metales impregnados en los catalizadores reducidos.

Catalizador	Composición (% p/p)		
	Níquel	Cobalto	Cerio
4Ni/Al ₂ O ₃	4,2	-	-
5Ni/Al ₂ O ₃	5,2	-	-
4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	4,2	4,1	-
12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	4,0	11,9	-
5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	5,1	-	2,0
5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	5,0	-	4,2
5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	4,8	-	6,2

4.1.1.2 Adsorción física de N₂

La distribución de tamaños de poros obtenidos a partir de las isotermas de adsorción para los catalizadores reducidos y el soporte alúmina calcinado se muestra en las **Figuras 4.1** y **4.2**. La relación entre las derivadas del volumen de poro y del diámetro de poro (dV/dD) disminuyó a medida que aumentó la cantidad de especies metálicas impregnadas, indicando que las partículas de metal depositadas bloquean parcialmente los poros del soporte γ -Al₂O₃ (Seo y col., 2011; Zangouei y col., 2010). Esta disminución en la relación dV/dD también fue observada al aumentar la carga de Ni, aunque fue mínima debido a la poca diferencia entre cargas utilizadas para este metal. Todos los materiales mostraron marcada presencia de mesoporos, con ausencia de poros por debajo de 25 Å y por encima de 500 Å. La ausencia de microporos (poros menores a 20 Å) fue debida a

las características del soporte, el cual se identificó como un sólido mesoporoso. La mayor cantidad de mesoporos correspondió a tamaños entre 60 y 120 Å, mientras que los restantes presentaron tamaños entre 120 y 225 Å, excepto para el catalizador con mayor carga de Co, donde se evidenció mayor cantidad de mesoporos con tamaños entre 120 y 215 Å. Fue evidente que la impregnación con Ni bloqueó mayormente los poros comprendidos entre 60 y 120 Å, mientras que la impregnación con Co o Ce bloqueó los poros entre 120 y 225 Å. La adsorción a bajas presiones parciales correspondió al cubrimiento de monocapa de mesoporos, mientras que el incremento en el volumen adsorbido a presiones relativas mayores a 0,4 estuvo relacionado con el llenado de los mesoporos (Vaudry y col., 1996).

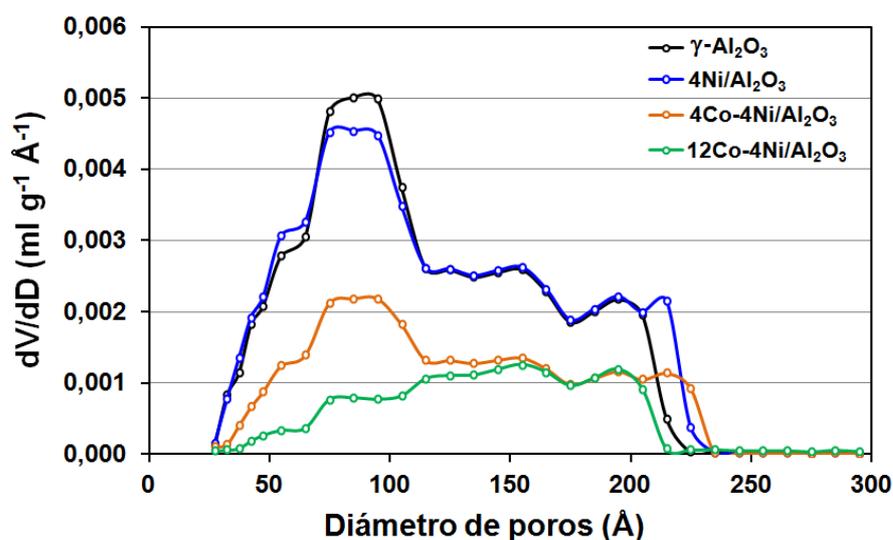


Figura 4.1: Distribución de tamaños de poro para los catalizadores de Ni y Co reducidos y el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinado.

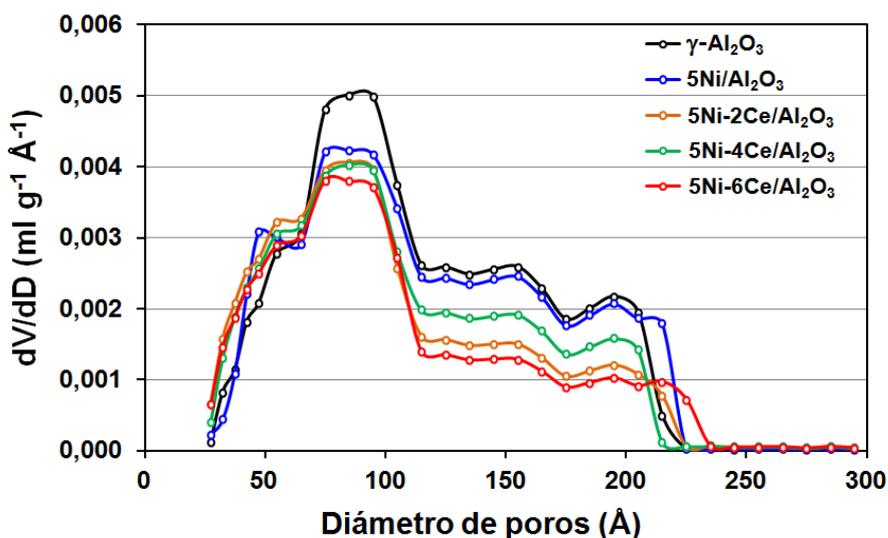


Figura 4.2: Distribución de tamaños de poro para los catalizadores de Ni y Ce reducidos y el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinado.

Las propiedades texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción para los materiales reducidos y el soporte alúmina calcinado son presentados en la **Tabla 4.2**. Para 4Ni/Al₂O₃ y 5Ni/Al₂O₃, la superficie específica (S_{BET}), volumen de poros (V_{P}) y diámetro medio de poros (DM_{P}) no varió significativamente respecto de los valores obtenidos para el soporte, sólo 5Ni/Al₂O₃ presentó S_{BET} menor que la del soporte. Sin embargo, S_{BET} y V_{P} disminuyeron en los catalizadores con Co y Ce al incrementar la cantidad de precursor impregnado, evidenciando el anclaje de las partículas metálicas en los poros de la γ -Al₂O₃ (Cheng y col., 2010a).

Los catalizadores con Co presentaron la mayor disminución de S_{BET} y V_{P} , siendo más pronunciada al aumentar la carga metálica, alcanzando 59,3 m² g⁻¹ y 0,1592 mL g⁻¹, respectivamente, con 12Co-4Ni/Al₂O₃. Esto fue asociado a la elevada carga empleada, que generó partículas metálicas de mayor tamaño (Vaudry y col., 1996). En los catalizadores con Ce, se observó una leve disminución de S_{BET} al incrementar la carga de metal, mientras que V_{P} fue prácticamente similar. En cuanto a DM_{P} , no existieron diferencias significativas entre los catalizadores bimetálicos de Co-Ni y los monometálicos, con valores similares a los del soporte sin adición de precursor. Para los catalizadores con Ce, DM_{P} fue similar entre las diferentes cargas, aunque apenas menor que para el soporte sin agregado de metal o los catalizadores monometálicos y bimetálicos Co-Ni. Fue evidente la disminución de las propiedades texturales para los catalizadores con Co y Ce respecto a los monometálicos, lo que indicó mayor obstrucción de los poros del soporte debido a la presencia de partículas metálicas depositadas (Chang y col., 2012).

Tabla 4.2: Propiedades texturales de los catalizadores reducidos y el soporte γ -Al₂O₃ calcinado.

Catalizador	S_{BET} (m ² g ⁻¹)	V_{P} (mL g ⁻¹)	DM_{P} (Å)
γ -Al ₂ O ₃	195,1	0,4771	97,8
4Ni/Al ₂ O ₃	194,2	0,5138	105,9
5Ni/Al ₂ O ₃	182,5	0,4776	104,7
4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	85,7	0,2527	108,0
12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	59,3	0,1592	107,4
5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	172,9	0,3945	91,2
5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	169,7	0,4135	94,5
5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	163,5	0,3703	90,6

4.1.1.3 Difracción de Rayos X

Los perfiles DRX para los catalizadores reducidos y el soporte γ -Al₂O₃ calcinado son presentados en las **Figuras 4.3** y **4.4**. Para todos los catalizadores, se observó la presencia del perfil propio del soporte γ -Al₂O₃, con un pico ancho de intensidad media a 38°, y dos picos definidos y más intensos a 46 y 68° (Iriondo y col., 2008). El pico a 38° también pudo corresponder a la formación de la estructura tipo espinela de aluminato de níquel (NiAl₂O₄) (Zhu y col., 2008), la cual también apareció a 46 y 68° aunque en una proporción menor. Esto ocurrió debido a que la γ -Al₂O₃ posee estructura de pseudo-espinela con características de red estructural similares a la formada por la especie NiAl₂O₄ (Lo Jacono y col., 1971). Si bien la fase cúbica de las especies NiO son normalmente observadas a 37, 43 y 63°, los perfiles obtenidos demostraron que sólo fue posible visualizar estas especies mediante un pico ancho a 43°. La presencia del pico ancho de NiO en las muestras de los catalizadores monometálicos se relacionó a una buena dispersión del metal, que resultó en partículas demasiado pequeñas para ser detectadas por DRX, junto con la formación de la fase NiAl₂O₄ durante la calcinación que posee un tamaño de partícula muy pequeño (Manfro y col., 2013).

Trabajos previos reportaron que al calcinar Ni/Al₂O₃ a 600°C, el patrón DRX mostró grandes picos a 37 y 44,8° (NiAl₂O₄), mientras que el pico a 43,2° (NiO) fue observado en menor proporción (Auroux y col., 2001). Además, γ -Al₂O₃ mostró débil presencia de la estructura pseudo-espinela, y en un material con 6,8% p/p de Ni sobre Al₂O₃ se observó débilmente la especie NiO además de NiAl₂O₄ (Lo Jacono y col., 1971). Catalizadores calcinados a 300°C mostraron picos a 43 y 65° (NiO), siendo solamente visibles para materiales con carga superior a 7,3% p/p de Ni, pues con cargas menores únicamente se obtuvo el perfil de la γ -Al₂O₃ (Mattos y col., 2004). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados previamente, observando perfiles similares para el soporte y los catalizadores preparados, sin grandes diferencias entre la γ -Al₂O₃ y los materiales monometálicos, posiblemente debido a la baja carga de Ni utilizada.

Para 4Ni/Al₂O₃, 5Ni/Al₂O₃ y 4Co-4Ni/Al₂O₃ se observó la presencia de un pequeño pico a 43°, que correspondió a NiO, y que estuvo asociado a la baja carga de Ni utilizada (Auroux y col., 2001) o a la adecuada dispersión de las especies metálicas en γ -Al₂O₃ (Profeti y col., 2009). El perfil que corresponde al catalizador 12Co-4Ni/Al₂O₃ presentó dos picos delgados a 31° y 33°, los cuales fueron

atribuidos a la presencia de especies óxido de cobalto libre (Co_3O_4), y estructuras tipo espinela de Ni y Co (NiCo_2O_4) (Luo y col., 2010); además, al aumentar la carga de Co, el pico a 38° se hizo más ancho, lo que podría asociarse a la presencia de especies CoAl_2O_4 superpuestas con las especies NiAl_2O_4 (Vaudry y col., 1996). La poca evidencia de Co_3O_4 en $4\text{Co-4Ni/Al}_2\text{O}_3$ indicaría que el mismo se encontró altamente disperso en el soporte, o bien interactuado con la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ o Ni formando especies compuestas (Luo y col., 2010).

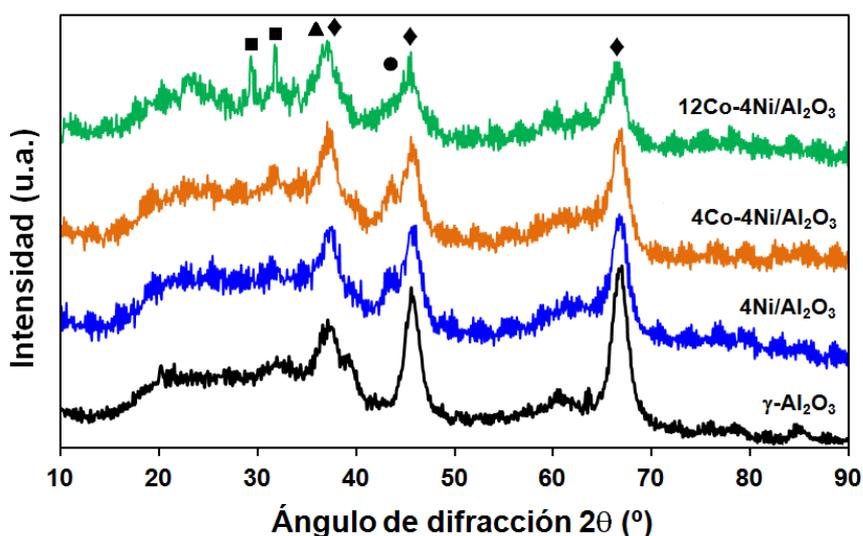


Figura 4.3: Perfiles DRX para los catalizadores de Ni y Co reducidos y el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinado. \blacklozenge : NiAl_2O_4 y $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$; \bullet : NiO ; \blacksquare : Co_3O_4 y NiCo_2O_4 ; \blacktriangle : CoAl_2O_4 .

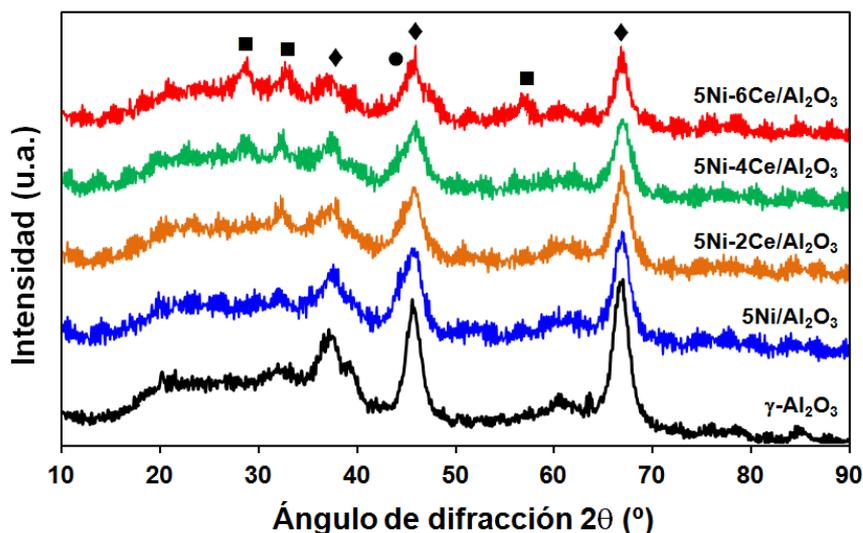


Figura 4.4: Perfiles DRX para los catalizadores de Ni y Ce reducidos y el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinado. \blacklozenge : NiAl_2O_4 y $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$; \bullet : NiO ; \blacksquare : CeO_2 .

Respecto a los catalizadores con Ce, a medida que aumentó la carga metálica se observaron picos a 29, 33 y 56°, los cuales fueron atribuidos a la presencia de especies cúbicas de CeO₂ con estructura cristalina tipo fluorita (Damyanova y col., 2002; Yu y col., 2006). Otros autores reportaron picos correspondientes al CeO₂ a 47°, aunque sólo a elevada carga de Ce (Iriondo y col., 2010). Los resultados obtenidos no mostraron el pico a 47°, posiblemente por la baja carga de Ce usada y el solapamiento con el pico de la γ -Al₂O₃ a 46°. Además, al aumentar la cantidad de precursor sobre el soporte, la intensidad de los patrones de difracción disminuyó, lo que indicó una deposición metálica relativamente homogénea que ocupa los huecos vacíos de la γ -Al₂O₃ (Bobadilla y col., 2012).

El diámetro promedio de los cristales de NiO (d_{NiO}), obtenidos con la ecuación de Scherrer y utilizando el plano (200) de NiO, son mostrados en la **Tabla 4.3**. Debido a que los picos obtenidos para NiO (alrededor de 43°) son pequeños, el cálculo se realizó mediante amplificación del pico para determinar su ancho a la altura media. Los tamaños medios de cristales de NiO fueron similares entre los materiales Ni/Al₂O₃ y Co-Ni/Al₂O₃, mientras que con Ni-Ce/Al₂O₃Ce exhibieron un aumento en el tamaño del cristal de NiO. Esto último pudo deberse al incremento en las interacciones entre las especies NiO y CeO₂ (Roh y col., 2004). El material 4Ni/Al₂O₃ presentó el menor tamaño medio de cristal, lo cual podría estar asociado a la gran dispersión de NiO combinado con la espinela de Ni y una fuerte interacción metal-soporte, reduciendo la movilidad de las partículas metálicas presentes (Manfro y col., 2013).

Tabla 4.3: Diámetro promedio de los cristales de NiO y valor del ángulo del plano (200) de NiO para los catalizadores reducidos.

Catalizador	d_{NiO} (nm)	Ángulo del pico (°)
4Ni/Al ₂ O ₃	11,39	43,9
5Ni/Al ₂ O ₃	13,33	44,1
4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	13,46	43,8
12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	14,84	43,7
5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	16,34	44,9
5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	19,36	44,8
5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	20,11	44,9

4.1.1.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Los perfiles FTIR para los catalizadores reducidos y soporte γ -Al₂O₃ calcinado se exhiben en las **Figuras 4.5 y 4.6**. Las bandas fueron identificadas en regiones de alta frecuencia (entre 4000 y 3000 cm⁻¹) y de baja frecuencia (2000 y 1000 cm⁻¹).

En la región de alta frecuencia se observó una banda intensa y ancha centrada en 3500 cm⁻¹, que correspondió a la interacción entre grupos OH del soporte y/o grupos del agua quimisorbida al soporte con los hidroxilos de la γ -Al₂O₃ mediante enlaces puente H (Stoilova y col., 2002), y una banda débil a 3780 cm⁻¹, debida a la presencia de grupos OH ácidos, neutros y básicos (Knözinger y Ratnasamy, 1978). En esta región, casi no fueron vistas diferencias entre los materiales 5Ni/Al₂O₃ y 5Ni-2Ce/Al₂O₃. Sin embargo, al incrementar la carga de metal (Ni, Co o Ce) sobre el soporte, se observó una importante disminución en la intensidad tanto de la banda principal como la banda a 3780 cm⁻¹. Para el caso del Ce, esto pudo ser debido al ocupamiento parcial de los sitios ácidos de la γ -Al₂O₃ por partículas de CeO₂, que presentan propiedades básicas (Padilla-Flores, 2009). Fue demostrado que las especies óxido metálico impregnadas disminuyen el grado de hidratación superficial del soporte, provocando menor intensidad de las bandas a medida que aumentó la carga de metal (Kapteijn y col., 1994a; Kapteijn y col., 1994b).

En la región de baja frecuencia se observó una banda definida a 1630 cm⁻¹ para 4Ni/Al₂O₃ y 5Ni/Al₂O₃, la cual aparece en el soporte, mientras la intensidad de la misma disminuyó al aumentar la carga de Ce y fue difícilmente visible al agregar Co. También apareció una banda menor a 1375 cm⁻¹ para los materiales con Co y Ce, siendo más importante al aumentar la carga del precursor. Las bandas a 1630 cm⁻¹ y 1375 cm⁻¹ fueron identificadas y asignadas al soporte; sin embargo la primera también ha sido atribuida a la adsorción del agua en la forma H-O-H (Turek y col., 1992). A 1150 cm⁻¹ apareció una pequeña banda, la cual fue reducida para 5Ni/Al₂O₃ y 5Ni-2Ce/Al₂O₃, pero se hizo más importante para 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃. Esto se ha asociado a que las especies Ce quedan ancladas al soporte y modifican su acidez (Padilla y col., 2013). La banda a 1150 cm⁻¹ fue mayor con 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃, y no fue vista con 4Ni/Al₂O₃, pudiendo atribuirse a la presencia de especie Co₃O₄ y NiCo₂O₄. Los resultados demostraron la presencia de grupos OH ácidos, neutros y básicos en γ -Al₂O₃, la formación de especies Ni, Co y Ce ancladas en la estructura del soporte y la disminución del grado de hidratación superficial de la γ -Al₂O₃ con el incremento en la carga metálica.

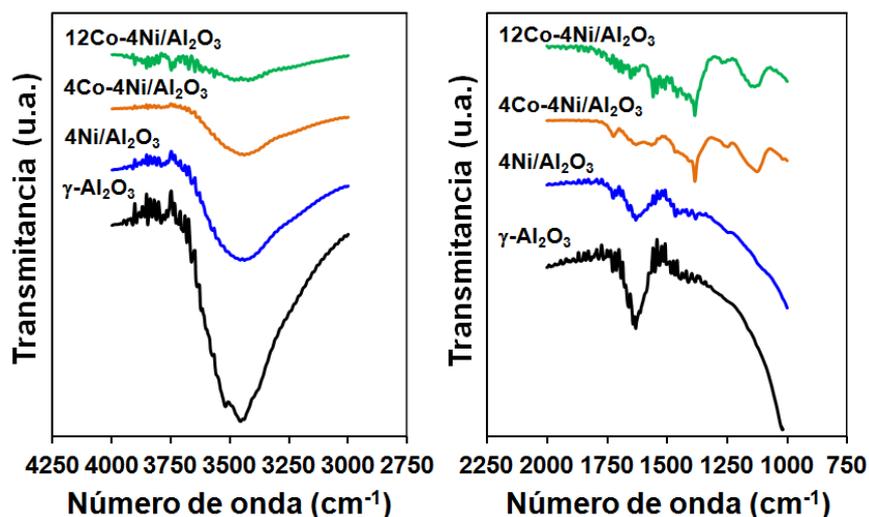


Figura 4.5: Perfiles FTIR para los catalizadores de Ni y Co reducidos y el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinado.

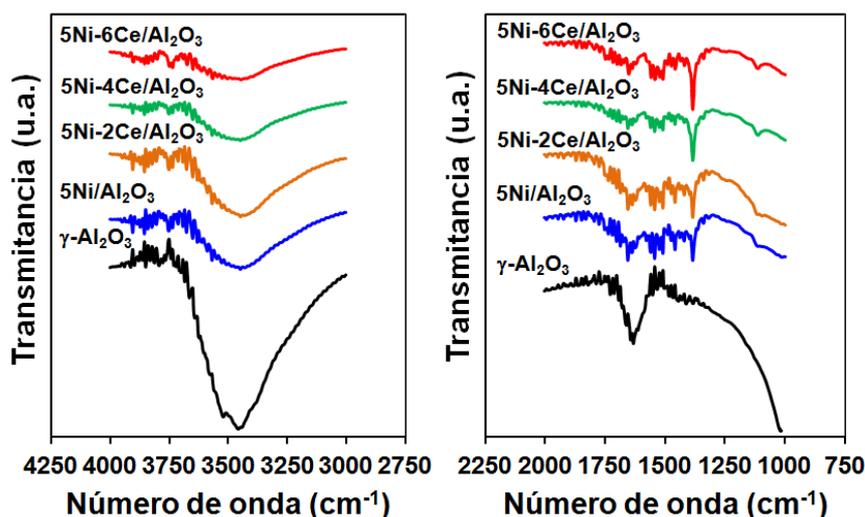


Figura 4.6: Perfiles FTIR para los catalizadores de Ni y Co reducidos y el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ calcinado.

4.1.1.5 Reducción a Temperatura Programada

Los perfiles de RTP correspondientes al soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ y a los catalizadores preparados calcinados son presentados en las **Figura 4.7a** y **4.7b**. El perfil de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ no presentó consumo de H_2 por la ausencia de sitios reducibles. Respecto a los catalizadores con Ni, se observó para ambas cargas un consumo suave de H_2 hasta 400°C , un pico de reducción bien definido entre 400 y 680°C , y luego un hombro entre 680 y 750°C ; el máximo del pico principal se centró en 570°C y el del hombro a 700°C . Resultados previos para catalizadores con 5 y 15% p/p de Ni indicaron la existencia de tres tipos diferentes de especies Ni sobre Al_2O_3 : NiO libre

o superficial (temperatura de reducción menor a 400°C), NiO unido a la Al_2O_3 (temperatura de reducción entre 400 y 690°C) y NiO incorporado en la estructura de Al_2O_3 mediante la formación de especies NiAl_2O_4 (temperatura de reducción superior a 700°C) (Rynkowski y col., 1993; Zhu y col., 2008). Empleando 4,1% p/p de Ni sobre Al_2O_3 calcinado a 400°C, se reportó baja presencia de NiAl_2O_4 debido a una pobre difusión de iones Ni hacia la red de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, mientras que el mismo material calcinado a 650°C presentó un marcado pico de reducción generado por la adecuada difusión de los iones Ni hacia el interior del soporte formando la especie NiAl_2O_4 (Scheffer y col., 1989). Los perfiles obtenidos mostraron que para las cargas de Ni utilizadas (4-5%), la principal especie presente fue NiO, mientras que la especie NiAl_2O_4 se encontró en mediana proporción, posiblemente debido a la temperatura de calcinación utilizada. La elevada temperatura necesaria para la reducción de los materiales con Ni, permitió considerar que las especies Ni impregnadas en Al_2O_3 fueron difíciles de reducir. En relación al consumo de H_2 , el material 5Ni/ Al_2O_3 presentó un perfil de mayor intensidad respecto a 4Ni/ Al_2O_3 , que resulta obvio por la mayor cantidad de especies Ni sobre el soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$.

Los perfiles de RTP para los materiales con Co y Ni, presentados en la **Figura 4.7a**, mostraron principalmente dos picos de reducción definidos. El pico de menor temperatura aparece entre 200 y 350°C, donde el material monometálico mostró muy poco consumo de H_2 , por lo que este pico se asoció a especies Co. El pico de mayor intensidad se corresponde con el pico principal de reducción del catalizador monometálico de Ni; al aumentar la carga de Co, el máximo del pico y el hombro posterior, ambos atribuidos a especies Ni se desplazan a menor temperatura, indicando un efecto sinérgico por la presencia de Co, mientras que el inicio del pico principal también se corre a menor temperatura y se define un hombro ancho, que se atribuyó a otras especies Co, así como otro hombro a muy alta temperatura (750-780°C). El comportamiento presentado indicó un proceso de reducción en dos etapas que ha sido caracterizado por la reducción inicial del Co_3O_4 hacia CoO a baja temperatura, y luego la transformación del CoO hacia Co^0 a mayor temperatura (Jacobs y col., 2004; Jacobs y David, 2007). Perfiles correspondientes a óxido de cobalto puro mostraron picos alrededor de 440 y 700°C (Abd El-Hafiz y col., 2014; Jongsomjit y col., 2001); también se reportó un pequeño pico alrededor de 800°C, asignado a la presencia de especies Co que se encuentran incorporadas en la estructura $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ mediante interacciones fuertes (Abd El-Hafiz y col., 2014).

Los perfiles de RTP para los materiales con Ce y Ni, presentados en la **Figura 4.7b**, muestran dos picos marcados de reducción, el primero entre 500 y 550°C, y el segundo entre 650 y 700°C. El primer pico fue asignado principalmente a la presencia de especies de NiO superficiales que interactúan débilmente con el soporte, mientras que el pico de reducción más importante incluye la reducción de las especies tipo espinela de níquel junto con la mayor parte de las especies de CeO₂, según ha sido previamente reportado (Iriondo y col., 2008). El pico a mayor temperatura indicó que las especies CeO₂ son principalmente reducidas hasta Ce₂O₃ (espinela de cerio no estequiométrica), requiriendo una temperatura similar que para la reducción de las especies NiAl_xO_y y NiAl₂O₄ (Abd El-Hafiz y col., 2014). Además, fue evidente el incremento en el tamaño de este pico al aumentar la carga de Ce, indicando la presencia de mayor cantidad de especies CeO₂ que son reducidas a Ce₂O₃ y que por ende consumen mayor cantidad de H₂. Al incrementar la carga de Ce se produce una disminución de la temperatura de reducción del pico principal del material 5Ni/Al₂O₃ (Chang y col., 2012; Valentini y col., 2003). Esto fue asociado a que la presencia de pequeñas cantidades de Ce podría facilitar la reducción del NiO presente, debido al debilitamiento de enlaces NiO-Al₂O₃ (Iriondo y col., 2010). En los perfiles Ni-Ce no se observó consumo de H₂ a baja (270-350°C) o elevada temperatura (880-900°C); a baja temperatura correspondería a la reducción de especies de NiO-CeO₂ (Wang y col., 2008), y a alta temperatura correspondería a la reducción de especies que interactúan fuertemente con el soporte, como CeO₂-Al₂O₃, lo que sólo fue observado al trabajar con mayores cargas de Ce (Abd El-Hafiz y col., 2014; Luo y col., 2010; Valentini y col., 2003).

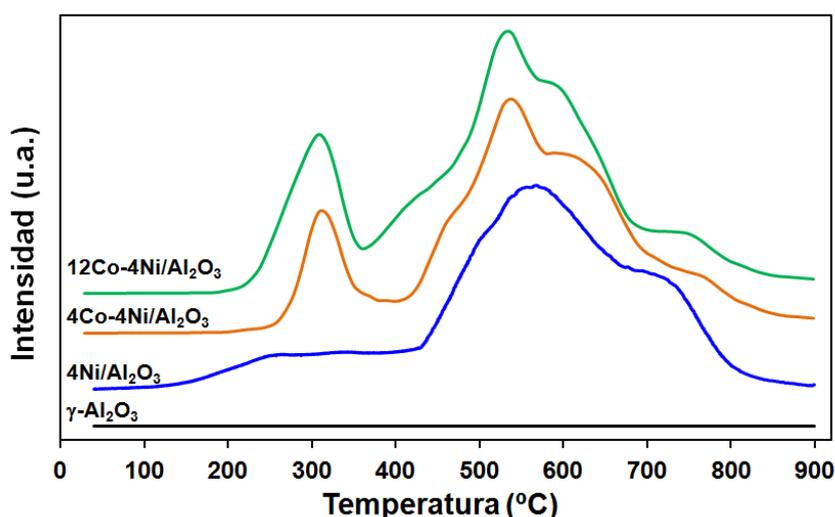


Figura 4.7a: Perfiles RTP para soporte γ -Al₂O₃ y catalizadores de Ni y Co calcinados.

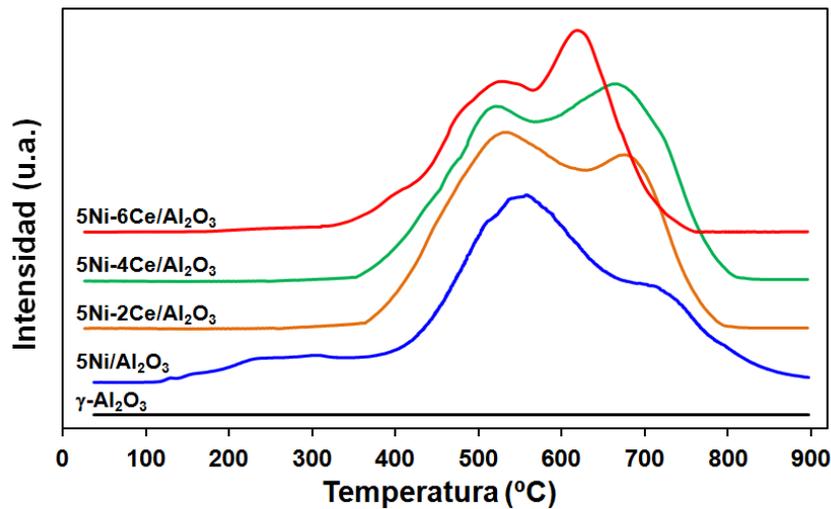


Figura 4.7b: Perfiles RTP para soporte γ - Al_2O_3 y catalizadores de Ni y Ce calcinados.

4.1.2 Evaluación catalítica en reformado en fase gas del glicerol

Previo a los ensayos de reformado en fase gas empleando los catalizadores preparados, se evaluó la reacción de descomposición térmica de glicerol (en ausencia de catalizador) a 700°C (condición más severa) y manteniendo las restantes condiciones operativas seleccionadas, para determinar el aporte de dicha descomposición y tener esta referencia al evaluar luego el desempeño de los catalizadores. Los valores obtenidos de X_T , X_G y X_L fueron 14,4; 10,3 y 4,1%, respectivamente, resultando P_{GS} 0,8. La composición inicial (a 15 min de reacción, primer análisis con DCT) de H_2 , CO , CO_2 y CH_4 fue 26,3; 30,9; 15,4 y 27,4%, respectivamente, mientras que la final (a 8 horas de operación) fue 30,0; 36,3; 12,4; y 21,3, respectivamente. Cuando se evaluó la reacción de descomposición térmica, la proporción de etileno (determinada por FID y cuantificada complementando el análisis con DCT) resultó significativa, por lo que se lo incluyó para recalcular la composición inicial de los gases, resultando 21,2; 24,9; 12,4; 22,1 y 19,4 de H_2 , CO , CO_2 , CH_4 y etileno, respectivamente, mientras que las finales fueron 21,4; 25,9; 8,9; 15,2 y 28,6, respectivamente. La S_{H_2} y el Y_{H_2} fueron 23,1 y 17,4, respectivamente. Los principales productos líquidos generados fueron propenal ($90,1 \text{ g L}^{-1}$), acetaldehído ($72,8 \text{ g L}^{-1}$), MHA ($18,4 \text{ g L}^{-1}$) y acetona ($10,7 \text{ g L}^{-1}$). En función del detalle cuantificado, el aporte de la reacción de descomposición térmica del glicerol a 700°C resultó menor, con baja conversión de glicerol (14,4%) y bajas selectividad y rendimiento a H_2 (23,1 y 17,4, respectivamente). En el reformado en fase gas entre 650 - 700°C , la descomposición térmica del glicerol genera principalmente una mezcla de acroleína ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}$) y acetaldehído ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$), pudiendo además formar CO ,

CO₂, CH₄, H₂ y C₂ debido a la escisión de enlaces y reacciones generadas por radicales libres (Stein y col., 1983). Los resultados de descomposición térmica de glicerol a 700 °C obtenidos en esta tesis coincidieron en los principales productos producidos, obteniendo además MHA y acetona, aunque en menor proporción que los productos líquidos mayoritarios, propenal y acetaldehído. La distribución de productos por descomposición térmica fue diferente a la obtenida en reacciones utilizando catalizadores, lo cual estaría asociado a los procesos catalíticos en que participan los productos de aquella descomposición de glicerol. En presencia de un catalizador, las cantidades de CO, CH₄ y etileno disminuyen mientras que las proporciones relativas de H₂ y CO₂ aumentan. Estos datos sugieren que la reacción de WGS fue favorecida desplazando el equilibrio hacia CO₂ e H₂, mientras que las reacciones de Boudouard y de hidrogenación del depósito carbonoso formado para generar CH₄ fueron menos activas (Bobadilla y col., 2012).

4.1.2.1 Catalizadores de Níquel-Cobalto

4.1.2.1.1 Distribución de productos

Las fracciones mayoritarias de gases eluyentes (H₂, CO₂, CO y CH₄) durante el reformado en fase gas del glicerol con 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ son presentados en la **Figura 4.8**. Para 4Ni/Al₂O₃ a 500 °C (**Fig. 4.8.a**), la fracción H₂ presentó constante incremento en 8 h de reacción, desde 60 a 70%, y la fracción CO₂ aumentó levemente para luego mantenerse constante durante el tiempo de reacción. La fracción CO disminuyó de 15% hasta alrededor 1% en 5 h de reacción, y la de CH₄ presentó valores bajos durante toda la operación. Para 4Ni/Al₂O₃ a 700 °C (**Fig. 4.8b**) la fracción H₂ disminuyó durante las primeras 2 h, de 60,2% hasta 54,3%; sin embargo, luego y hasta las 8 h mostró un leve incremento, superando el valor inicial. Por el contrario, la fracción CO₂ creció en las primeras 2 h y luego disminuyó hasta 22% a 8 h, mientras que CO y CH₄ aumentaron levemente con el tiempo de reacción, alcanzando a las 8 h 13,7 y 1,4%, respectivamente.

Para 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 300 °C (**Fig. 4.8c**) la fracción H₂ creció durante el tiempo de operación hasta 82% a las 8 h. Las fracciones CO₂ y CO fueron similares entre sí y decrecieron lentamente durante el tiempo de reacción hasta 10%. La fracción CH₄ fue baja durante toda la operación. Para 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 500 °C (**Fig. 4.8d**) el comportamiento fue notablemente similar que a 300 °C, indicando que el incremento de temperatura de operación prácticamente no modificó las fracciones obtenidas.

Con 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 700°C (**Fig. 4.8e**) la fracción H₂ fue elevada al inicio de la reacción (77,0%) hasta 3 h de operación, iniciando luego un marcado descenso hasta 56,1% a 8 h. La fracción CO₂ aumentó durante las primeras 4 h, para luego mantenerse constante hasta 8 h de operación (24,0%). Las fracciones CO y CH₄ se mantuvieron en valores constantes y similares hasta 4 h (4,0%), incrementándose luego en forma lenta hasta 8 h, alcanzando 13,1 y 7,5%, respectivamente. En este caso, no fueron observadas marcadas diferencias al comparar a 300 y 500°C, pero el aumento de la temperatura de reacción a 700°C provocó que la fracción H₂ sea elevada durante las primeras 2 h para luego decaer rápidamente. Además, pudo determinarse que las fracciones CO₂, CO y CH₄ aumentan con el tiempo de operación, contrariamente a lo que ocurrió a menores temperaturas de reacción.

Para 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 300°C (**Fig. 4.8f**), la fracción H₂ aumentó hasta 4 h, para luego decaer lentamente hasta 73% a 8 h. La fracción CO₂ disminuyó hasta las 4 h y luego presentó una leve recuperación hasta las 8 h de operación. La fracción CO disminuyó hasta 2 h para luego mantenerse en valores constantes de alrededor 5%, mientras que la fracción CH₄ fue baja en toda la reacción (1%). Con 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 500°C (**Fig. 4.8g**), la fracción H₂ creció durante las primeras 2 h, decayendo luego marcadamente hasta alcanzar 50% a las 8 h. La fracción CO₂ aumentó de 23 a 48% en 8 h, mientras CO decreció de 10 a 1% en el tiempo de operación. Al igual que a 300°C, la fracción CH₄ se mantuvo baja durante toda la reacción (1%). Para 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 700°C (**Fig. 4.8h**), la fracción inicial de H₂ (60,7%) fue similar a la alcanzada con 4Ni/Al₂O₃ a 700°C; sin embargo, con 12Co-4Ni/Al₂O₃ dicha fracción disminuyó con el tiempo de reacción hasta 4 h, y luego se mantuvo constante (alrededor de 52,0%) hasta 8 h. La fracción CO₂ disminuyó de forma constante durante la reacción, mientras que CH₄ se mantuvo constante (7%). La fracción CO mostró un notable incremento, con 27% a 8 h, y demostrando ser el único caso en que esta fracción superó la de CO₂ a tiempo final. La fracción CH₄ se mantuvo constante (alrededor de 7,5%) durante todo el tiempo de operación.

En condiciones de exceso de vapor, H₂, CO₂ y CO fueron los productos gaseosos mayoritarios, y CH₄ en menor proporción (Cheng y col., 2010a). Las fracciones H₂ y CO₂ fueron las principales en casi todas las condiciones analizadas, lo que indicó que la reacción WGS (**Ec. 2.12**) (Cheng y col., 2010b) y la reacción de reformado de glicerol (**Ec. 2.21**) (Cheng y col., 2010a) fueron favorecidas, mientras que la baja fracción CH₄ sugirió que el reformado con vapor del CH₄ fue activo (inversa de la **Ec. 2.23**) (Dou y col., 2009; Ramos y col., 2007). Para estos

catalizadores, el aumento de la temperatura provocó que la fracción H_2 sea menor y aumente de manera más lenta con el tiempo de operación, generando mayor cantidad de CO y similar de CO_2 para $4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$, mientras que se obtuvo mayor CO_2 y menor CO con el catalizador $4Co-4Ni/Al_2O_3$. El aumento del CO podría deberse a la inversa de las **Ecs. 2.36** y **2.39**, donde fue eliminado parte del carbón formado debido a la mayor temperatura de reacción. Por otro lado, el incremento en la cantidad de CO_2 y la disminución del CO podría estar relacionado al favorecimiento de las **Ecs. 2.36** y **2.37**. Para todos los casos, con la mayor temperatura se produjo más CO por la reacción de descomposición de glicerol (**Ec. 2.22**), favorable por encima de $650^\circ C$ (Wang y col., 2010), y mayor cantidad de CH_4 (excepto $4Ni/Al_2O_3$), posiblemente generada por la eliminación parcial del carbón formado con consumo de H_2 (inversa de la **Ec. 2.34**) (Cheng y col., 2010a), la reacción de hidrogenación del CO (inversa de la **Ec. 2.25**) y/o mediante la **Ec. 2.24**.

La incorporación de Co desfavoreció la producción de H_2 y favoreció la de CO_2 al aumentar la temperatura, y la formación de CH_4 se incrementó a mayor carga de Co. Con 4% p/p Co se produjo la mayor fracción de H_2 y la menor de CO_2 a menor temperatura, manteniendo bajos niveles de CO y CH_4 . El aumento de la carga a 12% p/p Co mostró un leve aumento en la producción de H_2 a menor temperatura.

Las fracciones mayoritarias de productos líquidos obtenidos en el reformado en fase gas del glicerol con $4Ni/Al_2O_3$, $4Co-4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ son detalladas en la **Figura 4.9**. Con $4Ni/Al_2O_3$ a $500^\circ C$ (**Fig. 4.9.a**) los principales productos fueron EtAL y Ac, los cuales presentaron elevada concentración inicial y luego decayeron con el tiempo de reacción. La concentración total de cada compuesto (promedio de relaciones entre concentraciones y volúmenes de líquido recuperado a cada hora) fue de 49,1 y 42,2 $g L^{-1}$, respectivamente. Para $4Ni/Al_2O_3$ a $700^\circ C$ (**Fig. 4.9b**) el comportamiento fue diferente, debido a que las fracciones aumentan con el tiempo de operación, siendo los principales compuestos MeAL y Ac con concentraciones totales 0,9 y 0,8 $g L^{-1}$, respectivamente. Con este material, la producción de compuestos condensados fue enormemente favorecida a $500^\circ C$.

Para $4Co-4Ni/Al_2O_3$ a $300^\circ C$ (**Fig. 4.9c**), los principales compuestos fueron Ac y MHA, con concentraciones finales de 9,3 y 7,7 $g L^{-1}$, respectivamente. Con $4Co-4Ni/Al_2O_3$ a $500^\circ C$ (**Fig. 4.9d**), los productos líquidos más importantes fueron MHA y 2-HEtAL, con concentraciones totales de 2,8 y 1,6 $g L^{-1}$, respectivamente. Con $4Co-4Ni/Al_2O_3$ a $700^\circ C$ (**Fig. 4.9e**), los mayoritarios fueron MeAL y EtAL, con 0,2 y 0,1 $g L^{-1}$, respectivamente. En estas condiciones, el comportamiento mostró una

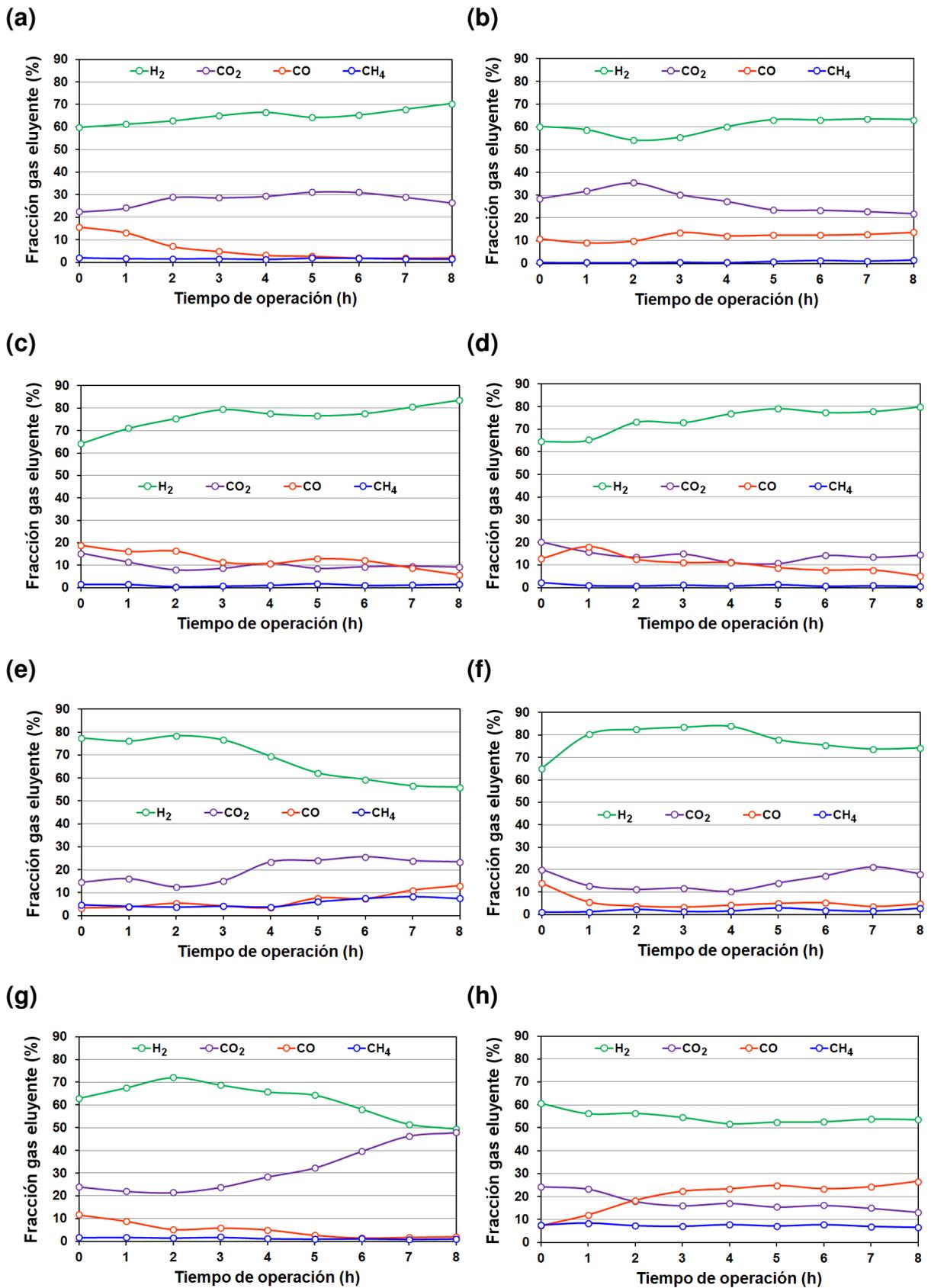


Figura 4.8: Fracción mayoritaria de gases (H₂, CO₂, CO y CH₄) obtenida en el reformado en fase gas de glicerol empleando 4Ni/Al₂O₃ a 500°C (a) y 700°C (b); 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 300°C (c), 500°C (d) y 700°C (e); 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 300°C (f), 500°C (g) y 700°C (h).

disminución en la concentración con el tiempo de reacción. Además, para este material, la producción de compuestos condensados fue superior a 300 °C.

Para 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 300 °C (**Fig. 4.9f**) y 500 °C (**Fig. 4.9g**) se produjeron en mayor importancia MHA y MeAL, con concentraciones totales de 1,0 y 0,5 g L⁻¹, respectivamente, a 300 °C, y de 9,5 y 5,7 g L⁻¹, respectivamente, a 500 °C. Con 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 700 °C (**Fig. 4.9h**), los productos líquidos más importantes fueron Ac y MeAL, con concentraciones de 62,2 y 25,5 g L⁻¹, respectivamente. A 300 y 500 °C, el comportamiento demostró una disminución en la concentración de compuestos líquidos con el tiempo de reacción, con valores relativamente bajos. Sin embargo, el comportamiento observado para este material a 700 °C, determinó un incremento en las concentraciones de productos a mayor tiempo de reacción. Las menores concentraciones de productos condensados se obtuvieron con 4Ni/Al₂O₃ y 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 700 °C, y con 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 300 °C. Respecto a todos los compuestos identificados en la fracción líquida, sólo 5 han sido identificados como mayoritarios: MHA, Ac, MeAL, EtAL y 2-HEtAL. Con 4Ni/Al₂O₃ se obtuvo MeAL, EtAL y Ac como mayoritarios, indicando la predominancia de reacciones sucesivas de deshidratación a partir del glicerol. Esta reacción puede ocurrir en el OH central o terminal del glicerol, dando lugar a la formación de dos intermedios fenol, que se reordenan para generar 3-hidroxiopropanal (poco estable) y MHA, respectivamente, y que posteriormente genera 2-propenal (acroleína) (Trimm, 1999; Bartholomew, 1982). Para 4Ni/Al₂O₃, el glicerol fue convertido en Ac a través de la generación de MHA, sin ser detectados 2-propenal y MHA, los cuales fueron reportados como principales productos de la deshidratación del glicerol (Zhou y col, 2008). También fueron generados EtAL y MeAL en un único paso por deshidratación, según fue descrito (Nimlos y col, 2006). Con 4Co-4Ni/Al₂O₃ se obtuvo MHA y Ac a 300 y 500 °C, composición diferente a la obtenida con 4Ni/Al₂O₃. El aumento de la temperatura a 700 °C favoreció la deshidratación del glicerol hacia MeAL y EtAL, al igual que en un reporte previo (Chai y col., 2007). Con 12Co-4Ni/Al₂O₃, se generó principalmente MHA y Ac, con MeAL como segundo producto mayoritario. Los resultados demostraron que la presencia de Co favoreció principalmente la formación de MHA y Ac, mientras que el aumento en la carga de Co permitió generar mayor cantidad de MeAL, y la cantidad de EtAL co-producido fue menor debido a su transformación hacia productos gaseosos (Araque y col., 2012). Además, los catalizadores bimetálicos presentaron mejor actividad hacia la

deshidratación del glicerol, presentando resultados que fueron consistentes con otros previamente reportados (Batista y col., 2004; Youn y col., 2006).

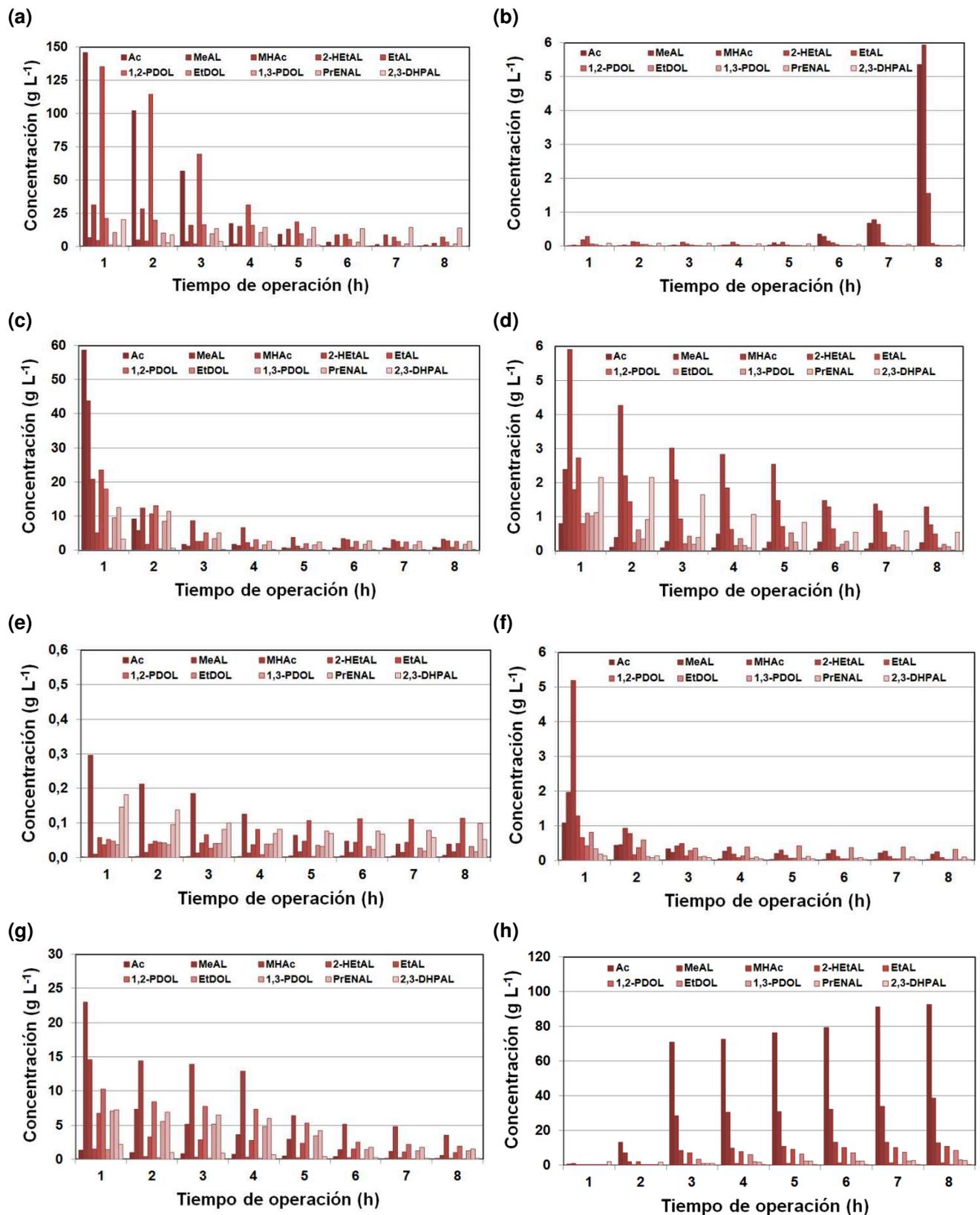


Figura 4.9: Fracción mayoritaria de compuestos en la fracción líquida, obtenida en el reformado en fase gas de glicerol empleando $4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C (a) y 700°C (b); $4\text{Co}-4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 300°C (c), 500°C (d) y 700°C (e); $12\text{Co}-4\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 300°C (f), 500°C (g) y 700°C (h).

4.1.2.1.2 Parámetros obtenidos

La conversión de glicerol obtenida a 4 y 8 h de reacción, y los parámetros X_T , X_G , X_L y R_{GS} obtenidos en el reformado en fase gas de glicerol para 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ a diferentes temperaturas de reacción son presentados en la **Tabla 4.4**. A 300 °C, las conversiones fueron bajas; X_T y X_G alcanzaron 33,4 y 32,1% para 4Co-4Ni/Al₂O₃, respectivamente, mientras que con 12Co-4Ni/Al₂O₃ los valores son aún más bajos. Ambos materiales presentaron también baja X_L , con valores depósitos carbonosos cercanos a 0,7%C referido al glicerol alimentado, favorecido por reacciones como la deshidrogenación de CH₄ (**Ec. 2.34**) que genera H₂ e incrementa el depósito carbonoso sobre el catalizador (Cheng y col., 2010a); la R_{GS} fue menor con 4Co-4Ni/Al₂O₃. Al llevar a cabo la reacción a 500 °C, las conversiones aumentaron respecto de los valores obtenidos a 300 °C; al incrementar la carga de Co, X_T , X_G y X_L decrecen marcadamente. El material con mayor carga de Co formó un depósito carbonoso de 0,5%C referido al glicerol alimentado, resultando menor que el formado sobre los demás materiales evaluados, mientras que la menor R_{GS} (5,4) se alcanzó con 4Co-4Ni/Al₂O₃. A 700 °C, las conversiones de glicerol fueron mayores de 96,1%, independiente de los catalizadores y del tiempo de operación; X_T fue elevada para todos los materiales, mientras que 12Co-4Ni/Al₂O₃ alcanzó la mayor X_G . Se detectaron bajos valores de depósito carbonoso (entre 0,2 y 0,4%C referido al glicerol alimentado); esto se relacionó a la eliminación parcial del depósito carbonoso formado consumiendo parte del H₂ formado, al elevar la temperatura de operación (Cheng y col., 2010a).

Tabla 4.4: Conversiones (%) y R_{GS} (H₂/CO) obtenidas en reformado en fase gas de glicerol para 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ en reacción a 300, 500 y 700 °C.

T (°C)	Catalizador	Conversiones (%)					R_{GS} (H ₂ /CO)
		4 h	8 h	X_T	X_G	X_L	
300	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	33,2	24,8	33,4	32,1	1,3	6,4
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	24,3	19,8	25,4	24,2	1,2	18,3
500	4Ni/Al ₂ O ₃	54,6	42,3	63,9	44,1	19,8	18,8
	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	41,9	32,8	47,4	40,2	7,2	5,4
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	30,2	9,3	37,5	32,2	5,3	19,6
700	4Ni/Al ₂ O ₃	99,8	99,9	99,8	76,9	22,9	4,5
	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	100,0	100,0	100,0	61,9	38,1	11,1
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	96,7	96,1	96,8	89,0	7,8	2,5

Se generaron las relaciones más bajas de R_{GS} con $4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ a $700^\circ C$; este último presenta adecuada R_{GS} para uso directo (Xu y col., 1999). Al aumentar la carga de Co y disminuir la temperatura, disminuyeron las X_T y X_G .

Los valores de selectividades (S_{H_2} y S_C) y rendimientos (Y_{H_2} y Y_C) a principales productos obtenidos en el reformado en fase gas de glicerol para $4Ni/Al_2O_3$, $4Co-4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ a diferentes temperaturas son presentados en las **Tablas 4.5 y 4.6**. Las mayores S_{H_2} a cada temperatura fueron obtenidas con la menor carga de Co, alcanzando la mayor S_{H_2} a $500^\circ C$. El valor de Y_{H_2} disminuyó al incrementar la carga de Co, mientras que a las menores temperaturas el Y_{CO_2} aumentó y el Y_{CO} disminuyó con el incremento de la carga metálica, de acuerdo a información previa (Ramos y col., 2007). Sin embargo, un comportamiento muy diferente ocurrió a $700^\circ C$, debido a que el Y_{CO_2} disminuyó y el Y_{CO} aumentó cuando la carga de Co se incrementó, lo cual influyó de manera positiva respecto a los rendimientos de los gases obtenidos (Ramos y col., 2007), generando una R_{GS} adecuada para utilización directa (Xu y col., 1999). La formación de compuestos gaseosos C_2 posiblemente sea debida a la hidrogenación-deshidrogenación de EtAL (Araque y col., 2012; Adhikari y col., 2009). Aunque el material con mayor carga de Co a $700^\circ C$ generó menor Y_{H_2} , las X_T y X_G obtenidas durante la reacción resultaron ser elevadas y adecuadas en el tiempo de operación. Este catalizador responde a resultados determinados previamente, donde se reportó que la relación óptima de Ni y Co sobre un soporte de alúmina fue de 1:3 (Luo y col., 2010).

Tabla 4.5: Selectividades a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol para $4Ni/Al_2O_3$, $4Co-4Ni/Al_2O_3$ y $12Co-4Ni/Al_2O_3$ en reacción a 300, 500 y $700^\circ C$.

T ($^\circ C$)	Catalizador	Selectividades (%)								
		H ₂	CO ₂	CH ₄	CO	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
300	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	68,7	41,6	4,8	52,0	1,1	0,4	0,0	0,1	0,0
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	66,5	63,5	8,5	19,3	3,0	2,3	0,0	2,1	1,3
500	4Ni/Al ₂ O ₃	75,3	77,2	4,1	12,2	3,2	2,9	0,1	0,2	0,1
	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	88,0	48,8	3,3	37,2	1,7	8,6	0,1	0,3	0,0
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	74,2	83,5	3,1	10,1	1,1	2,1	0,0	0,0	0,0
700	4Ni/Al ₂ O ₃	61,1	68,4	1,4	29,5	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0
	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	72,1	51,9	14,2	17,8	14,5	1,4	0,1	0,1	0,0
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	52,7	21,8	9,7	28,4	32,0	6,0	0,8	1,1	0,1

Tabla 4.6: Rendimientos a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol para 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ en reacción a 300, 500 y 700 °C.

T (°C)	Catalizador	Rendimientos (%)								
		H ₂	CO ₂	CH ₄	CO	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
300	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	53,3	38,6	4,4	48,2	1,0	0,4	0,0	0,1	0,0
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	53,6	61,3	8,2	18,6	2,9	2,2	0,0	2,0	1,3
500	4Ni/Al ₂ O ₃	41,7	44,4	2,4	7,0	1,8	1,7	0,1	0,1	0,1
	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	61,1	37,2	2,5	28,3	1,3	6,5	0,1	0,2	0,0
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	58,3	72,5	2,7	8,8	1,0	1,8	0,0	0,0	0,0
700	4Ni/Al ₂ O ₃	60,8	67,8	1,4	29,3	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0
	4Co-4Ni/Al ₂ O ₃	72,1	51,7	14,1	17,7	14,4	1,4	0,1	0,1	0,0
	12Co-4Ni/Al ₂ O ₃	42,5	17,6	7,8	22,9	25,8	4,8	0,6	0,9	0,1

4.1.2.1.3 Depósitos de carbón

Los perfiles obtenidos mediante la técnica OTP para 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ luego del reformado del glicerol en fase gas y a las temperaturas evaluadas, junto con las concentraciones de carbón obtenidas a tiempo final son mostrados en la **Figura 4.10.1**. En los perfiles a 300 °C (**Fig. 4.10.1a**), la oxidación del carbón depositado se produjo desde 200 hasta 550-600°C, mostrando un pico intenso con máximo en 390-400°C. El material 12Co-4Ni/Al₂O₃ generó menor formación de carbón a 300 °C respecto de 4Co-4Ni/Al₂O₃, indicando que el aumento de la carga metálica mejoró la resistencia a la deposición de carbón (**Fig. 4.10.1d**). Debido a que ambos perfiles mostraron eliminación del carbón a baja temperatura, fue probable que la mayoría de los depósitos formados correspondan a carbón del tipo amorfo (filamentoso o whisker) (Rynkowski y col., 1995; Bartholomew, 2001). En los perfiles a 500 °C (**Fig. 4.10.1b**), la oxidación del carbón se produjo de diferentes formas: 4Ni/Al₂O₃ presentó un gran pico con máximo centrado en 500°C, 4Co-4Ni/Al₂O₃ un único pico centrado en 400 °C, y 12Co-4Ni/Al₂O₃ dos picos, centrados en 400 y 600 °C, respectivamente. Fue probable que los picos a menor temperatura correspondan a carbón amorfo y los de mayor temperatura a carbón grafitico (Silverhood y col., 2010; Bartholomew, 2001). El perfil para 4Ni/Al₂O₃ indicó la existencia de cantidades importantes de ambos tipos de depósitos, que conforman un único pico durante el análisis. Con 12Co-4Ni/Al₂O₃ se generó la menor cantidad de carbón a 500 °C, con un valor inferior al observado a 300 °C (**Fig.**

4.10.1d). A 700 °C (**Fig. 4.10.1c**), los perfiles 4Ni/Al₂O₃ y 4Co-4Ni/Al₂O₃ mostraron un único pico centrado en 600 °C, y 12Co-4Ni/Al₂O₃ dos picos a 400 y 500 °C. Este último produjo la mayor cantidad de carbón a 700 °C (**Fig. 4.10.1d**), el cual correspondió a carbón del tipo grafitico. En los catalizadores con Ni, el metal puede disolver los residuos de carbón no reactivos y generar filamentos de carbón con partículas Ni en la parte superior de los filamentos (Wei y col., 2004), sin embargo los resultados obtenidos demostraron que esto podría ser observado a menores temperaturas de operación, mientras que al aumentar la temperatura fueron generadas menores cantidades de carbón amorfo (filamentoso) pero mayores de carbón grafitico con el incremento de la carga metálica. Según ha sido demostrado, las principales reacciones que generaron deposición de carbón sobre el catalizador son la de Boudouard (**Ec. 2.36**) y la descomposición del CH₄ (**Ec. 2.34**) (Luo y col., 2010). El material 4Co-4Ni/Al₂O₃ a 700 °C generó el menor valor de concentración final de carbón (8,9 mg C gcat⁻¹ h⁻¹) en todas las condiciones evaluadas. Los catalizadores modificados con Co presentaron menor formación de carbón respecto al material monometálico a la misma temperatura, de acuerdo a lo reportado previamente (Ramos y col., 2007), siendo la excepción 12Co-4Ni/Al₂O₃ a 700 °C.

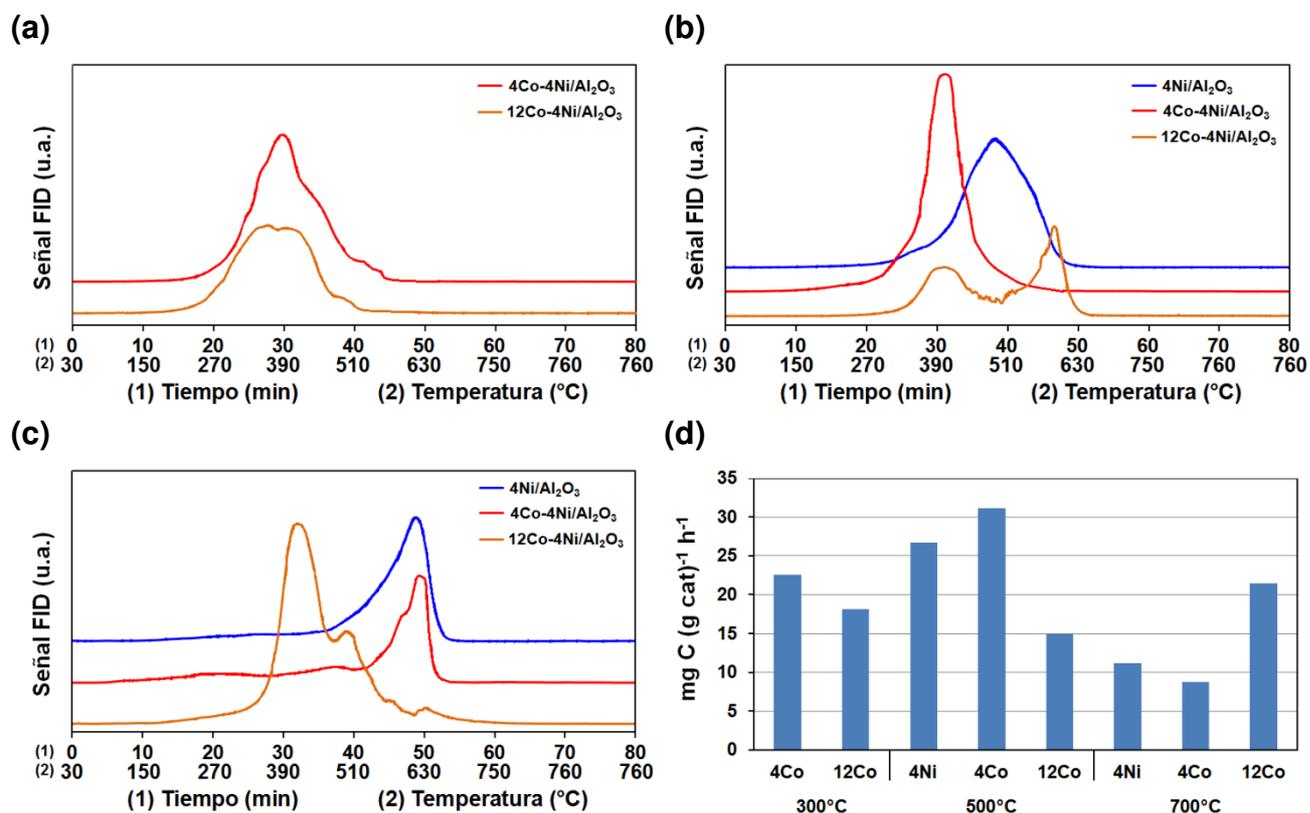


Figura 4.10.1: Perfiles de OTP obtenidos para los catalizadores 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ al finalizar la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 300 °C (a), 500 °C (b) y 700 °C (c), y concentraciones finales de carbón para cada material (d).

Los espectros de FTIR y los patrones de DRX obtenidos para los catalizadores 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ luego de la reacción de reformado en fase gas de glicerol son presentados en la **Figura 4.10.2**. Los espectros FTIR (**Fig. 4.10.2a, b y c**) mostraron, comparando con los catalizadores antes de la reacción, una marcada disminución en la intensidad de las bandas a 3500 y 3780 cm⁻¹, las cuales han sido asignadas a la interacción entre grupos OH y/o grupos del agua quimisorbida con los OH del soporte γ -Al₂O₃ (Stoilova y col., 2002); la presencia de depósitos carbonosos en la superficie ocasionó una disminución en la hidratación superficial de los materiales, explicando el comportamiento presentado. Los perfiles mostraron también bandas centradas aproximadamente a 1010, 1380, 1580 y 2930 cm⁻¹, las cuales tuvieron distinto comportamiento en función de la temperatura de reacción. La banda a 1010 cm⁻¹, muy marcada a 300°C, disminuyó al aumentar la temperatura, desapareciendo a 700°C para 4Ni/Al₂O₃ y 4Co-4Ni/Al₂O₃. Las bandas a 1380 y 1580 cm⁻¹ prácticamente no se vieron a 300°C, y aumentaron al aumentar la temperatura de reacción, siendo completamente definidas a 700°C. Las bandas a 2930 cm⁻¹ mostraron un comportamiento cualitativamente similar al anterior pero siendo mucho menos intensas. La banda a 1010 cm⁻¹ fue previamente asignada a enlaces C-O y al estiramiento del enlace C-C, mientras que la señal débil a 2850 cm⁻¹ fue atribuida a la presencia del enlace C-H (Cheng y col., 2012). Bandas alrededor de 750-1000 cm⁻¹ corresponden a vibraciones típicas de los enlaces C-H de tipo aromático, mientras que bandas entre 2750 y 2980 cm⁻¹ fueron asignadas a vibraciones de los enlaces -CH₂ y -CH₃ asimétricos y simétricos de grupos alquilo, indicando la presencia de cadenas alifáticas con posibles ramificaciones (Rojas y col., 2010). Bandas a 1036-1045 cm⁻¹ fueron asignadas a señales ν CC, mientras que una banda a 1399 cm⁻¹ se asoció a especies olefínicas (Sheppard y col., 1996; Li y Stair, 1997). Bandas a 1515 y 1630 cm⁻¹ fueron asignadas a grupos aromáticos y olefínicos, respectivamente (Andy y col., 1998; Trombetta y col., 1997). La banda a 1590 cm⁻¹ ha sido asignada a la naturaleza aromática del depósito, así como las bandas a 1513-1524 a enlaces C=C aromáticos, mientras que bandas a 2960 y 2868 cm⁻¹ fueron asociadas a vibraciones stretching de CH en especies saturadas (Trombetta y col., 1997). En función de lo anterior, se considera que al aumentar la temperatura de reacción, el depósito carbonoso formado cambió su naturaleza, mostrando características olefínicas cuando la reacción fue realizada a 500°C y principalmente aromática cuando la reacción se condujo a 700°C.

Los perfiles DRX de los materiales luego de la reacción (**Figuras 4.10.2d, e y f**) mostraron la presencia de tres picos a 25, 43 y 54°, que no aparecían antes de la reacción, y que fueron asignados a los planos de difracción (002), (100) y (110), respectivamente, correspondiente a carbono gráfico (Rajarao y Bhat., 2012; Li y col., 2008). Otros autores concuerdan que el pico a 26° es evidencia de la presencia de carbono cristalino de tipo gráfico, sin observar carbón de naturaleza amorfa (Hardiman y col., 2004). Parte de señal obtenida a 43° podría corresponder

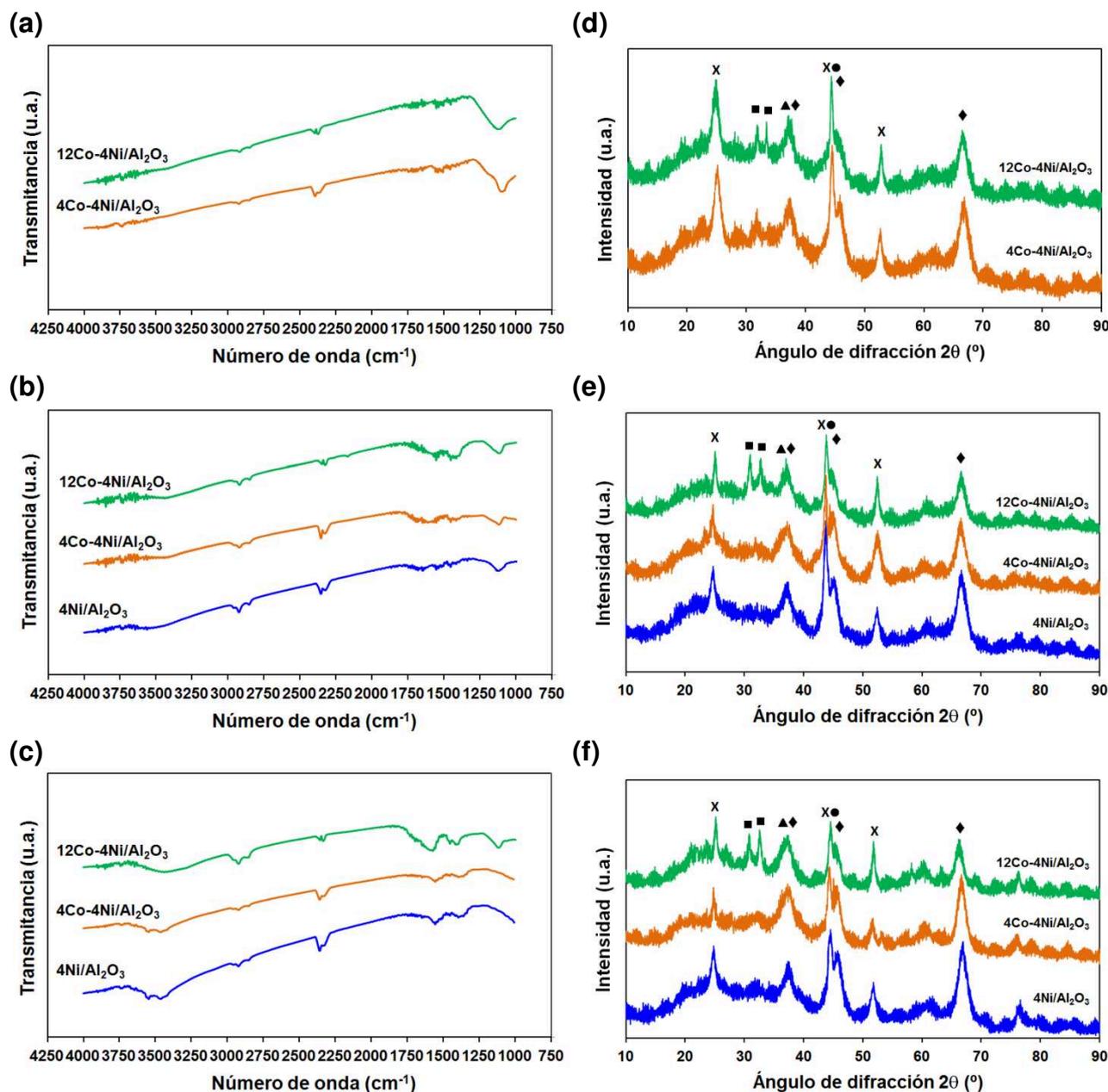


Figura 4.10.2: Espectros de FTIR (izquierda) y patrones de DRX (derecha) obtenidos para 4Ni/Al₂O₃, 4Co-4Ni/Al₂O₃ y 12Co-4Ni/Al₂O₃ luego de la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 300°C (**a**) y (**d**), 500°C (**b**) y (**e**), y 700°C (**c**) y (**f**). ♦: NiAl₂O₄ y γ-Al₂O₃; ●: NiO; ■: Co₃O₄ y NiCo₂O₄; ▲: CoAl₂O₄. X: Carbon.

a la presencia de especies NiO y espinela de Co, que son parcialmente reducidas durante la reacción. La presencia de picos a 77° sólo fueron evidentes a 700°C, lo que indicó la presencia de especies Co y Ni metálicas, que también fueron reportadas a 53° (Cheng y col., 2012). En general, las muestras corridas a 300 y 500°C mostraron picos de mayor tamaño, lo cual se correspondió con mayores depósitos de carbón. A 700°C, los picos obtenidos fueron de menor tamaño, sugiriendo que los precursores del depósito carbonoso podrían ser más fácilmente removidos de la superficie a esta mayor temperatura (Blesa y col., 2012). Al analizar los diferentes catalizadores, el agregado de Co demostró poca influencia sobre la prevención de la formación de carbón, pues los picos relacionados al mismo son similares al incrementar la carga del metal.

4.1.2.2 Catalizadores de Níquel-Cerio

4.1.2.2.1 Distribución de productos

Las fracciones mayoritarias de gases eluyentes (H_2 , CO_2 , CO y CH_4) durante el reformado en fase gas del glicerol con $5Ni/Al_2O_3$, $5Ni-2Ce/Al_2O_3$, $5Ni-4Ce/Al_2O_3$ y $5Ni-6Ce/Al_2O_3$ son presentados en la **Figura 4.11**. Al evaluar el comportamiento catalítico a 500°C (**Fig. 4.11a, c, e y g**), la fracción de H_2 se mantuvo prácticamente constante, con pequeñas variaciones entre valores de 70-75%, siendo la única excepción $5Ni-4Ce/Al_2O_3$ debido a que la fracción inicial de H_2 fue 55% y luego de 3 h alcanzó valores de alrededor 70%. Respecto a los gases CO_2 , CO y CH_4 , se observaron comportamientos similares para todos los materiales evaluados. La fracción CO_2 se mantuvo en valores entre 20-30% hasta 8 h, mientras que la de CH_4 fue constante y reducida alrededor de 1-4% en todo el tiempo de reacción. La fracción inicial de CO fue alrededor de 15% para todos los catalizadores a los que se les adicionó Ce, descendiendo hasta alcanzar valores de 2-3% a las 5 h, y siendo luego constante durante el resto de la reacción. En cambio, para $5Ni/Al_2O_3$, la fracción inicial de CO fue 6% y descendió hasta 2% a las 3 h, siendo constante hasta el fin de la reacción. Respecto al comportamiento catalítico a 700°C (**Fig. 4.11b, d, f y h**), la mayor fracción inicial de H_2 se obtuvo con $5Ni/Al_2O_3$ (63%), mientras que con los catalizadores modificados con Ce, esta fracción estuvo entre 50-56%. La cantidad de H_2 aumentó para todos los materiales hasta 65-70% a 4-5 h para comenzar luego a decaer hasta el fin de la reacción, con excepción de $5Ni-6Ce/Al_2O_3$ donde se observó un comportamiento diferente, en donde la fracción de este gas creció hasta alcanzar 60% a las 8 h. La fracción CO_2 fue de 15-25%

durante toda la reacción, excepto 5Ni-6Ce/Al₂O₃, donde la fracción CO₂ decreció de 40% a 20% de forma continua en 8 h de operación. La fracción CO presentó una tendencia similar y constante (10-20%) para los materiales hasta 8 h, excepto 5Ni-4Ce/Al₂O₃, donde la cantidad generada fue algo superior (20-28%) en el tiempo total. La fracción CH₄ fue constante y menor al 4% en 8 h, excepto para 5Ni-4Ce/Al₂O₃ donde se observó un incremento hasta 8% al final de la reacción.

Al comparar ambas temperaturas de operación, se observó que con 5Ni/Al₂O₃ las fracciones H₂ y CH₄ no mostraron grandes diferencias, mientras que la fracción CO₂ fue menor y la de CO mayor a 700 °C. Para los demás catalizadores con Ce, la fracción H₂ disminuyó mientras que CH₄ fue apenas superior a mayor temperatura de reacción. La fracción CO₂ se mantuvo constante con 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500 y 700 °C, sin embargo esta fracción disminuyó y aumentó con 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃, respectivamente, al incrementar la temperatura. Hubo un incremento en la fracción CO para todos los materiales al aumentar la temperatura (5-8 veces superiores respecto a 500 °C), presentando 5Ni-4Ce/Al₂O₃ el mayor incremento.

Con 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃ y 5Ni-4Ce/Al₂O₃ para ambas temperaturas, el aumento en la fracción inicial de H₂ durante las primeras horas de reacción se asoció al tiempo que necesitó el catalizador para llegar al régimen de actividad, disminuyendo luego por ensuciamiento y bloqueo parcial de sitios metálicos activos por reacciones de formación de carbón (**Ec. 2.37** y **2.38**) y sinterización (Soares y col., 2006). La formación de carbón fue producto de reacciones de deshidratación, craqueo y polimerización que ocurren en los sitios ácidos de la Al₂O₃ (Ni y col., 2007), mientras que el sinterizado de las partículas metálicas fue debido a la limitada resistencia térmica del soporte (Seo y col., 2009). Este comportamiento no se observó para 5Ni-6Ce/Al₂O₃ a ambas temperaturas, siendo evidente una mayor estabilidad del material durante el tiempo de reacción. Este comportamiento fue posiblemente debido a la adecuada capacidad del CeO₂ de distribuir O₂ a través de la red estructural del material, aumentando la reversibilidad redox al elevar la carga metálica (Alvarez-Galvan y col., 2008), favoreciendo la gasificación del depósito carbonoso gracias al O₂ ($C + O_2 \rightarrow CO_2$; $2C + O_2 \rightarrow 2CO$) (Alberton y col., 2007; Liguras y col., 2003), e incrementando la reacción de intercambio de gas-vapor de agua (**Ec. 2.12**) (De lima y col., 2008; Diagne y col., 2004). También fue favorecida la remoción del carbón depositado mediante reacciones que consumen parte del H₂ formado para generar CH₄ (**Ec. 2.34**), generando una mayor fracción de CO y menor fracción H₂ respecto a 500 °C (Liguras y col., 2003).

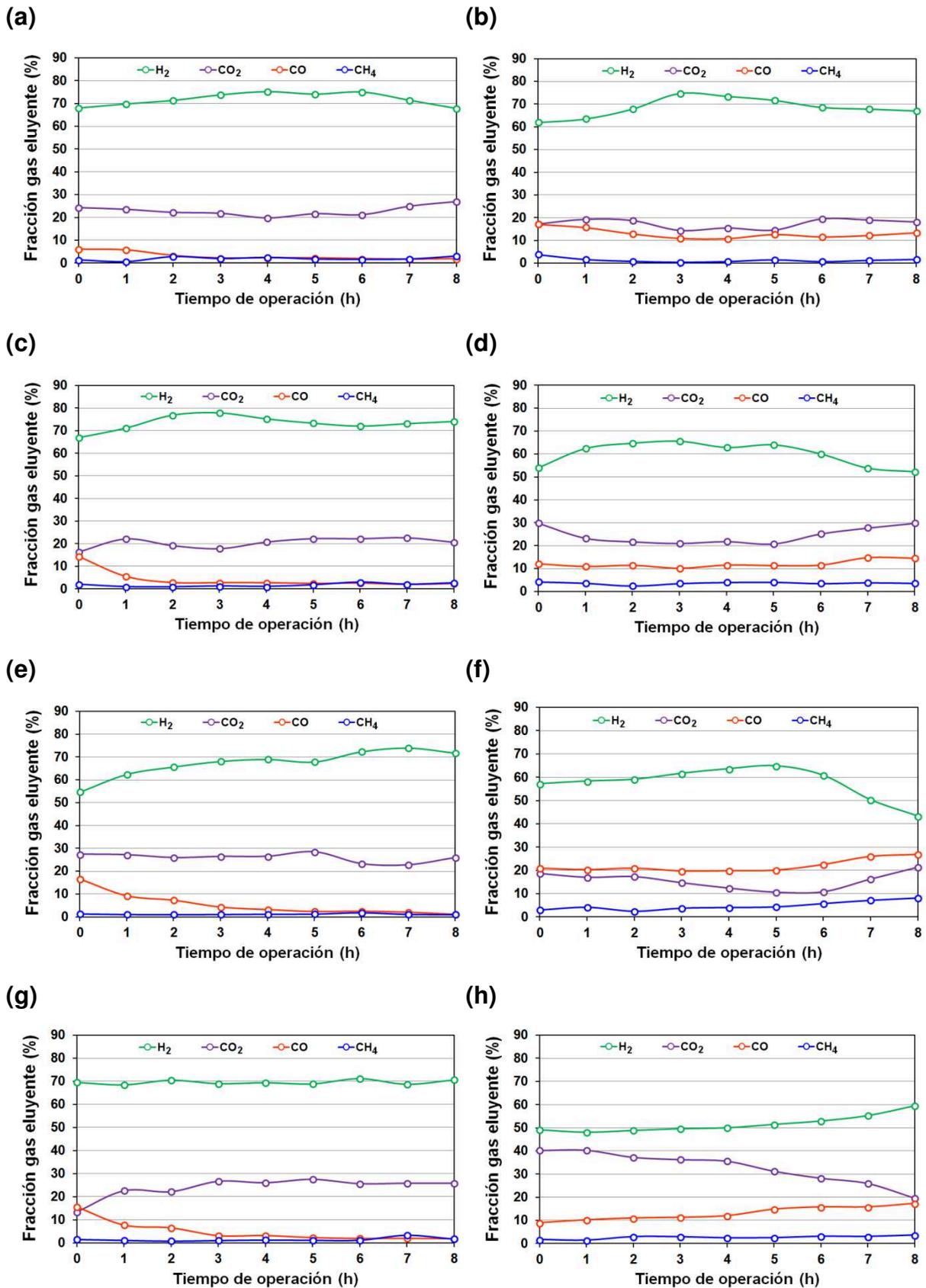


Figura 4.11: Fracción mayoritaria de gases (H₂, CO₂, CO y CH₄) obtenida en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃ a 500°C (a) y 700°C (b); 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C (c) y 700°C (d); 5Ni-4Ce/Al₂O₃ a 500°C (e) y 700°C (f); y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ a 500°C (g) y 700°C (h).

Las fracciones mayoritarias de productos líquidos obtenidos en el reformado en fase gas del glicerol con 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ son mostradas en la **Figura 4.12**. Con 5Ni/Al₂O₃ a 500°C (**Fig. 4.12.a**) los productos principales fueron 2,3-DHPAL y MHA, el primero obtenido a elevada concentración inicial, y con tendencia a disminuir a medida que transcurrió el tiempo de operación. La concentración total de estos productos fue 95,1 y 27,1 g L⁻¹, respectivamente. Para el mismo material a 700°C (**Fig. 4.12b**) el comportamiento fue diferente, con incremento en las concentraciones de las fracciones con el tiempo de operación. Los principales productos fueron MeAL y 2-HEtAL con concentraciones totales de 0,2 y 0,1 g L⁻¹, respectivamente. De similar manera que para el material 4Ni/Al₂O₃, la producción de compuestos en la fracción líquida fue favorecida a 500°C.

Para 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C (**Fig. 4.12c**), los productos líquidos aumentan con el tiempo de reacción, siendo más importantes 2-HEtAL y EtAL (concentraciones finales 160,4 y 7,9 g L⁻¹, respectivamente). Para el mismo material a 700°C (**Fig. 4.12d**) los compuestos aumentaron con el tiempo, siendo más importantes Ac y MeAL (7,8 y 4,3 g L⁻¹, respectivamente). La formación de compuestos condensados disminuye en gran medida para este material al aumentar la temperatura.

Con 5Ni-4Ce/Al₂O₃ a 500°C (**Fig. 4.12e**) los principales compuestos fueron Ac y MHA, con concentraciones totales de 16,3 g L⁻¹ para ambos productos. A 700°C (**Fig. 4.12f**) se generó principalmente MeAL y Ac, con concentraciones de 11,9 y 3,9 g L⁻¹, respectivamente. Con este material, se observó un incremento en los productos generados con el tiempo de reacción a ambas temperaturas. Sin embargo, resultó interesante detallar que a 500°C los principales productos líquidos fueron acompañados por otros compuestos y en importantes concentraciones. A 700°C, los restantes compuestos fueron generados en baja proporción, indicando que el aumento de temperatura limitó la formación de productos líquidos.

Para 5Ni-4Ce/Al₂O₃ ocurrió un comportamiento similar al del caso anterior. A 500°C (**Fig. 4.12g**) apareció mayormente MHA y Ac, con concentraciones de 19,4 y 6,8 g L⁻¹, respectivamente, acompañados de numerosos productos líquidos. A 700°C (**Fig. 4.12h**), MeAL y Ac fueron los más importantes, a concentraciones finales 0,8 y 0,3 g L⁻¹, respectivamente, y con baja proporción de otros compuestos. Nuevamente, el incremento en la temperatura de operación disminuyó de forma drástica la producción de compuestos en la fracción acuosa.

A 500°C, el comportamiento demostró aumento en la formación de compuestos líquidos con el tiempo de reacción (excepto 5Ni/Al₂O₃), siendo observadas mayores

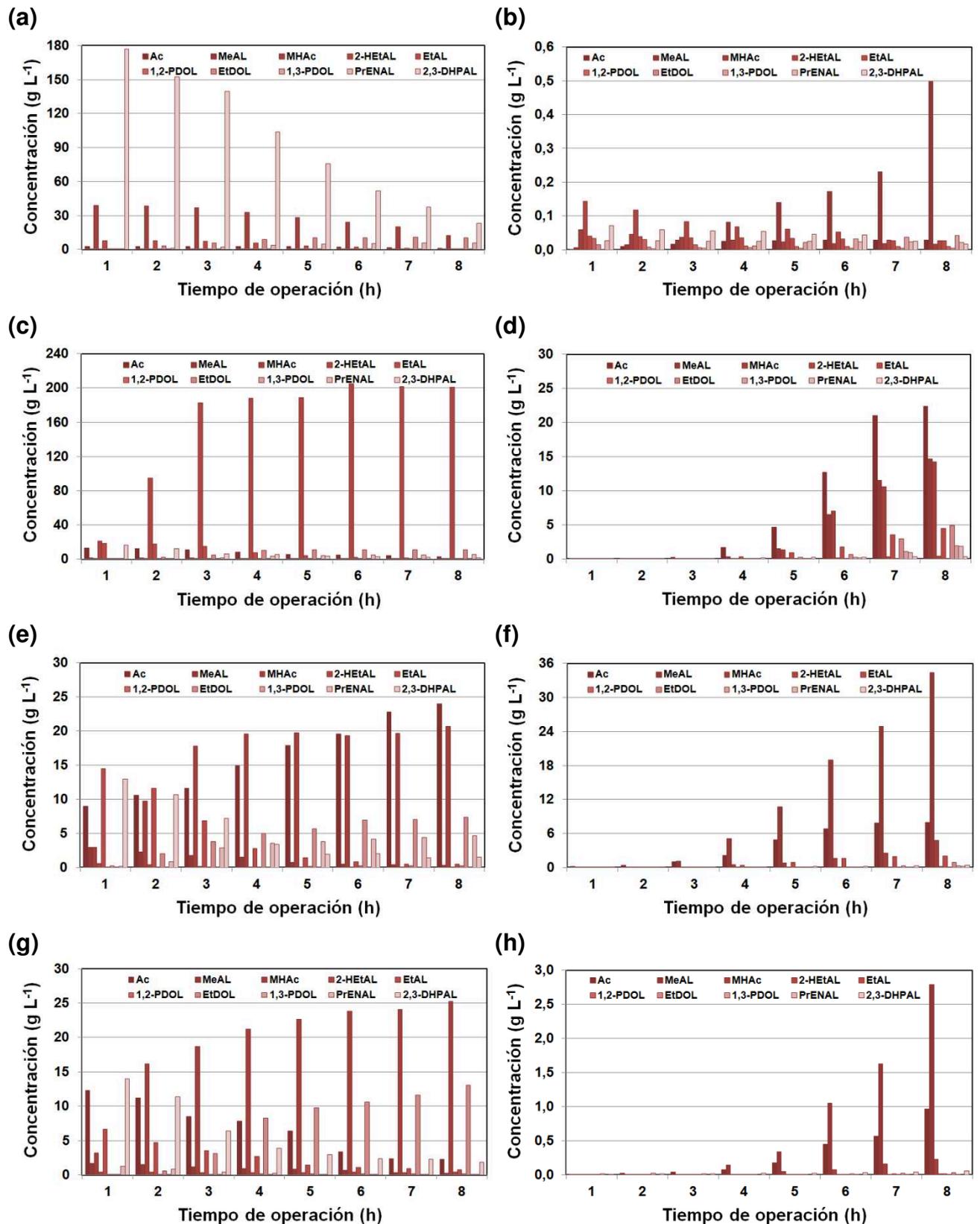


Figura 4.12: Fracción mayoritaria de compuestos en la fracción líquida, obtenida en el reformado en fase gas de glicerol empleando $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C (a) y 700°C (b); $5\text{Ni}-2\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C (c) y 700°C (d); $5\text{Ni}-4\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C (e) y 700°C (f); y $5\text{Ni}-6\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C (g) y 700°C (h).

concentraciones con $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $2\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, y con baja generación de otros productos. A mayor carga de Ce ($4\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $6\text{Ce}-5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$), fueron obtenidas menores concentraciones de líquidos y mayor presencia de productos secundarios. A 700°C , fue notable la disminución en los valores de concentraciones obtenidas respecto a 500°C , notándose baja proporción de restantes compuestos y además, una importante disminución en las proporciones al incrementar la carga de Ce. Las menores concentraciones de productos fueron obtenidas con todos los materiales a 700°C . Igual que para los catalizadores con Co, los principales compuestos identificados en la fracción líquida fueron MHA, Ac, MeAL, EtAL y 2-HEtAL.

Con $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $5\text{Ni}-2\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C se obtuvo 2,3-DHPAL y 2-HEtAL como compuestos mayoritarios, respectivamente, lo cual indicó que la deshidratación no fue la vía preferida. En este caso, la ruta consistió en la transformación del glicerol mediante reacciones secuenciales de deshidrogenación, decarbonilación y deshidratación, generando 2,3-DHPAL, 1,2-EtDOL y EtAL, respectivamente (King y col., 2010). El EtAL podría ser hidrogenado a etanol (en el caso de tratarse de APR), pero la vía más factible sería la descomposición hacia gases. Por otro lado, el 2-HEtAL pudo obtenerse por deshidrogenación del 1,2-EtDOL, siendo la principal vía utilizada a baja carga de Ce. Con $5\text{Ni}-4\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $5\text{Ni}-6\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ a 500°C se obtuvieron MHA y Ac como compuestos principales, lo que indicó que la deshidratación del glicerol hacia MHA y Ac fue activa, sin ser detectado el 2-propenal, el cual fue reportado como principal producto de la deshidratación del glicerol junto con la MHA (Zhou y col, 2008). Al aumentar la temperatura a 700°C se obtuvo principalmente MeAL y 2-HEtAL con $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, lo que determinó un cambio respecto al comportamiento a menor temperatura. La obtención de MeAL estuvo acompañada de la co-producción de EtAL en una única deshidratación, según ha sido descrito (Nimlos y col, 2006), mientras que el 2-HEtAL se obtuvo por deshidrogenación del 1,2-EtDOL. El incremento de la carga de cerio a 700°C no provocó diferencias entre los compuestos obtenidos, siendo MeAL y Ac los principales. Esto demostró que el aumento de la temperatura favoreció la deshidratación del glicerol hacia MeAL y Ac, siendo débilmente detectados MHA y EtAL (Chai y col., 2007). Se generó menor cantidad de MeAL al aumentar la carga de Ce a 700°C , con baja presencia de EtAL debido a su transformación hacia productos gaseosos (Araque y col., 2012), mientras que el aumento de la carga a 500°C direcciono la deshidrogenación del glicerol en la vía MHA y Ac, sin cambios importantes en las concentraciones totales.

4.1.2.2.2 Parámetros obtenidos

La conversión de glicerol obtenida a 4 y 8 h de reacción, y los parámetros X_T , X_G , X_L y R_{GS} obtenidos en el reformado en fase gas de glicerol para $5Ni/Al_2O_3$, $5Ni-2Ce/Al_2O_3$, $5Ni-4Ce/Al_2O_3$ y $5Ni-6Ce/Al_2O_3$ a 500 y 700°C son mostrados en la **Tabla 4.7**. A 500°C, la conversión, independiente de la carga de Ce, disminuyó de 85-89% a 4 h a 39,7-54,6% a 8 h, alcanzando el valor más bajo (39,7%) para $5Ni-6Ce/Al_2O_3$; la X_G fue mayor al aumentar la carga de Ce, mientras que la X_L disminuyó. Los valores de depósito carbonoso formado, independiente de la carga de Ce alcanzaron aproximadamente 0,7%C referido al glicerol alimentado, siendo favorecido por la presencia de reacciones que forman dichos depósitos, tales como la deshidrogenación de CH_4 (**Ec. 2.34**) que genera H_2 pero aumenta el depósito carbonoso (Cheng y col., 2010a). La R_{GS} alcanzó valores entre 24,1 y 30,0%, resultando de poco interés para favorecer la obtención directa de gas de síntesis. A 700°C, la X_T fue prácticamente total, superando 98,3%, mientras que X_G aumentó al incrementar la carga de metal. Los depósitos carbonosos fueron menores que los observados a 500°C; esto puede asociarse a que la presencia del CeO_2 favorece la gasificación del depósito carbonoso (Alberton y col., 2007; Liguras y col., 2003) y/o su remoción mediante reacciones que consumen parte del H_2 formado (**Ec. 2.34**) (Liguras y col., 2003). A 700°C, la conversión mejoró notablemente y la R_{GS} fue más promisoria para obtener la mezcla correspondiente a gas de síntesis que a 500°C, por lo que la descomposición del glicerol cobró importancia (**Ec. 2.22**) debido al aumento de temperatura, junto con reacciones que producen la eliminación parcial del depósito carbonoso formado y consumen CO_2 generando CO (**Ec. 2.36**), o reacciones que generan CO e H_2 eliminando carbón (**Ec. 2.37**). El agregado de Ce disminuyó la R_{GS} respecto a $5Ni/Al_2O_3$, siendo $5Ni-4Ce/Al_2O_3$ el que alcanzó valores óptimos para la utilización directa de la mezcla H_2/CO en procesos de Fischer-Tropsch (Xu y col., 1999); con $5Ni-6Ce/Al_2O_3$ fueron obtenidos valores cercanos al óptimo, por lo que sería de interés ensayar este catalizador a mayor tiempo de operación, debido a que logra conversión total y la mayor conversión a gases (81,9%).

Tabla 4.7: Conversiones (%) y P_{GS} en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ en reacción a 500 y 700°C.

T (°C)	Catalizador	Conversiones (%)					R_{GS} (H ₂ /CO)
		4 h	8 h	X _T	X _G	X _L	
500	5Ni/Al ₂ O ₃	85,1	54,6	78,2	42,4	35,8	30,0
	5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	88,6	45,4	75,6	44,5	31,1	24,9
	5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	85,7	52,1	77,6	47,8	29,8	24,1
	5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	84,8	39,7	73,4	49,5	23,9	24,8
700	5Ni/Al ₂ O ₃	100,0	100,0	100,0	65,6	34,4	5,6
	5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	99,9	94,0	98,3	69,8	28,5	5,2
	5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	100,0	98,8	99,7	75,3	24,4	2,5
	5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	100,0	100,0	100,0	81,9	18,1	3,6

Los valores de selectividades (S_{H_2} y S_C) y rendimientos (Y_{H_2} y Y_C) a principales productos obtenidos en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ a diferentes temperaturas son mostrados en las **Tablas 4.8** y **4.9**. Las mayores S_{H_2} fueron logradas con 5Ni/Al₂O₃ y 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C, mientras 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ presentaron valores algo menores pero comparables con el que se obtuvo con 5Ni/Al₂O₃ a 700°C. Las S_{H_2} para los catalizadores con Ce a 700°C fueron poco menores que la obtenida con 5Ni/Al₂O₃, lo cual demostró que si bien existió un incremento en la reacción de intercambio de gas-vapor de agua (**Ec. 2.12**) (De lima y col., 2008; Diagne y col., 2004), también se favoreció la remoción parcial del carbón depositado mediante reacciones que consumen H₂ formado para generar CH₄ (**Ec. 2.34**), y generando mayores Y_{CO} y menores Y_{H_2} respecto a lo que fue observado a 500°C (Liguras y col., 2003). Los menores Y_{CO_2} fueron identificados con 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C y con 5Ni-4Ce/Al₂O₃ a 700°C, mientras que para este último el Y_{CO} fue comparable con el generado por 5Ni/Al₂O₃. Esto demostró la importancia de 5Ni-4Ce/Al₂O₃ a 700°C para R_{GS} (Xu y col., 1999), mientras que 5Ni-2Ce/Al₂O₃ a 500°C representó un catalizador con mayores aptitudes para la producción de H₂, sobre todo debido al empleo de una menor temperatura de operación. Por otro lado, si bien 5Ni-6Ce/Al₂O₃ a 700°C generó adecuados Y_{H_2} e Y_{CO} , fue el material que produjo la mayor proporción de CO₂ a dicha temperatura.

Tabla 4.8: Selectividades a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ en reacción a 500 y 700°C.

T (°C)	Catalizador	Selectividades (%)								
		H ₂	CO ₂	CH ₄	CO	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
500	5Ni/Al ₂ O ₃	82,4	79,9	7,3	9,5	1,4	1,7	0,0	0,1	0,1
	5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	84,9	78,7	6,5	11,1	1,7	1,6	0,1	0,1	0,2
	5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	78,3	80,4	3,7	12,8	1,4	1,5	0,1	0,0	0,1
	5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	79,5	80,5	4,7	11,3	1,7	1,6	0,1	0,1	0,2
700	5Ni/Al ₂ O ₃	76,9	56,3	3,2	40,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	67,1	57,7	8,5	28,9	3,4	0,8	0,2	0,2	0,2
	5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	62,3	30,0	10,0	43,9	13,0	2,2	0,3	0,4	0,1
	5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	57,2	63,7	5,5	27,0	3,1	0,3	0,2	0,1	0,0

Tabla 4.9: Rendimientos a principales productos (%) en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ en reacción a 500 y 700°C.

T (°C)	Catalizador	Rendimientos (%)								
		H ₂	CO ₂	CH ₄	CO	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
500	5Ni/Al ₂ O ₃	49,9	49,9	4,6	5,9	0,9	1,0	0,0	0,0	0,1
	5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	43,1	41,2	3,4	5,8	0,9	0,9	0,0	0,0	0,1
	5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	59,9	63,6	2,9	10,1	1,1	1,2	0,0	0,0	0,1
	5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	62,7	66,3	3,9	9,3	1,4	1,3	0,1	0,0	0,1
700	5Ni/Al ₂ O ₃	76,8	55,7	3,2	39,8	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	5Ni-2Ce/Al ₂ O ₃	63,5	54,6	8,1	27,4	3,2	0,8	0,2	0,2	0,2
	5Ni-4Ce/Al ₂ O ₃	60,2	28,8	9,6	42,3	12,5	2,1	0,3	0,4	0,1
	5Ni-6Ce/Al ₂ O ₃	57,0	63,4	5,5	26,9	3,1	0,3	0,2	0,1	0,0

4.1.2.2.3 Depósitos de carbón

Los perfiles obtenidos mediante la técnica OTP para 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ luego del reformado del glicerol en fase gas y a las temperaturas evaluadas, junto con las concentraciones de carbón obtenidas a tiempo final son mostrados en la **Figura 4.13.1**. En perfiles a 500°C (**Fig. 4.13.1a**), la oxidación del carbón se produjo desde 250 hasta 600-630°C para todos los catalizadores, con un pico intenso con máximo en 480-500°C. Según los perfiles, el

carbón formado correspondió principalmente al de tipo amorfo (eliminado a baja temperatura) (Bartholomew, 2001; Silverhood y col., 2010). Al evaluar la formación de carbón a 500 °C (**Fig. 4.13.1c**), se observó disminución en las concentraciones de los depósitos al aumentar la carga de Ce, lo que demostró mejor actividad hacia la eliminación del carbón formado al aumentar la cantidad de metal. Posiblemente la mayor oxidación del carbón depositado al aumentar la carga de Ce ocurrió debido a una mayor presencia de partículas metálicas en la interfase metal-soporte, según ha sido reportado (Noronha y col., 2001). En perfiles a 700 °C (**Fig. 4.13.1b**) se observó que la oxidación del carbón se produjo a elevada temperatura para todos los materiales, alrededor de 630-650 °C, lo que indicó una mayor presencia de carbón gráfico (Bartholomew, 2001; Noronha y col., 2001). Nuevamente, las cantidades de carbón disminuyeron al aumentar la carga de Ce (excepto 5Ni-4Ce/Al₂O₃), con valores inferiores a los observados a 500 °C, lo cual podría deberse a que una mayor carga de Ce genera mayor distribución de O₂ a través de la red estructural del material, aumentando la reversibilidad redox (Alvarez-Galvan y col., 2008) y favoreciendo la gasificación del depósito carbonoso formado gracias a la presencia del O₂) (Alberton y col., 2007; Liguras y col., 2003). A 700 °C, 5Ni-6Ce/Al₂O₃ mostró los menores valores de concentración final de carbón (8,5 mg C g cat⁻¹ h⁻¹), siendo aún menor que para el mejor material con Co (4Co-4Ni/Al₂O₃).

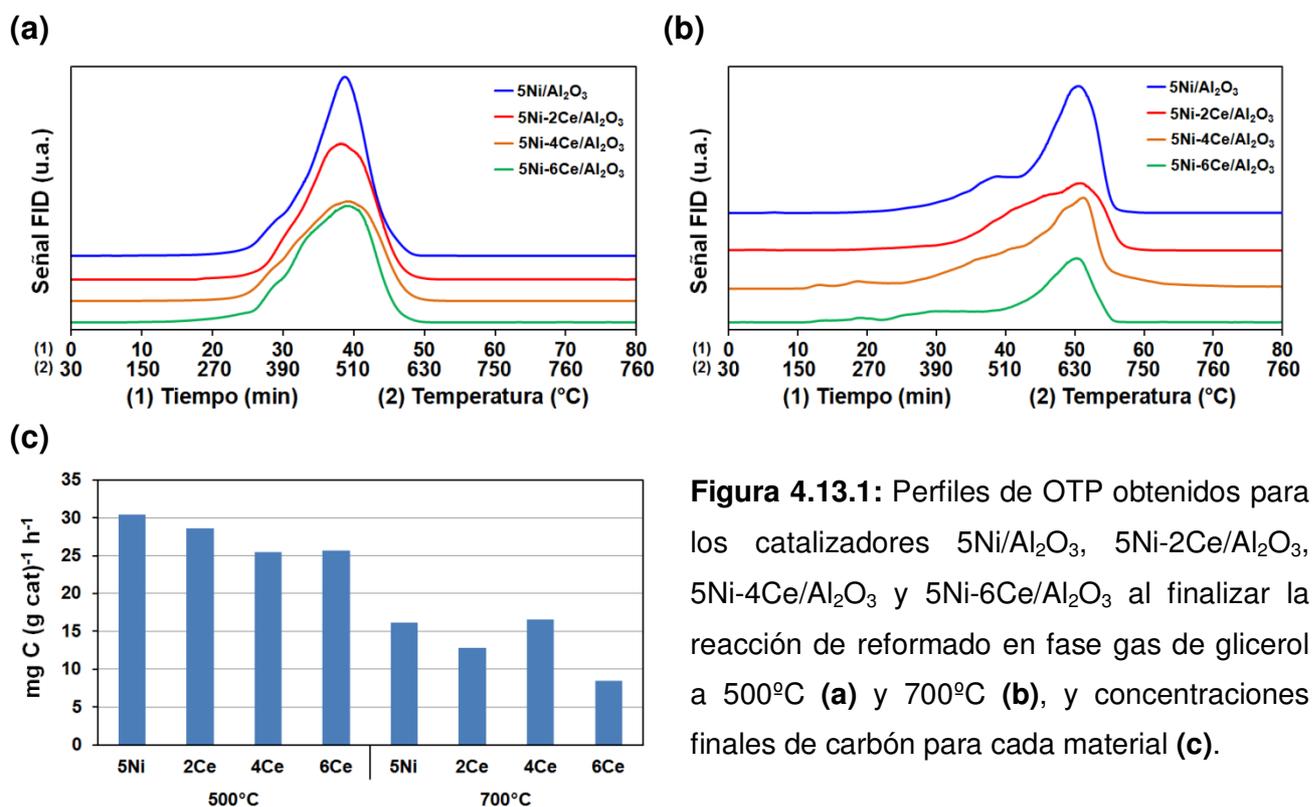


Figura 4.13.1: Perfiles de OTP obtenidos para los catalizadores 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ al finalizar la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 500 °C (a) y 700 °C (b), y concentraciones finales de carbón para cada material (c).

Los espectros de FTIR y patrones DRX obtenidos para los materiales $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $5\text{Ni}-2\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $5\text{Ni}-4\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $5\text{Ni}-6\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ luego de la reacción de reformado en fase gas de glicerol son presentados en la **Figura 4.13.2**. Los espectros FTIR (**Figuras 4.13.2a** y **b**) mostraron, comparando con los correspondientes catalizadores antes de la reacción, una marcada disminución en la intensidad de las bandas a 3500 y 3780 cm^{-1} , similar a lo encontrado para los catalizadores con Co; por lo tanto, el comportamiento se explicó considerando la presencia de depósitos carbonosos en la superficie, los que disminuyeron la hidratación superficial de los materiales. Los perfiles mostraron también bandas centradas aproximadamente a 1010 , 1380 , 1580 y 2930 cm^{-1} , diferenciándose el comportamiento en función de la temperatura de reacción y no por la carga de Ce. A 500°C , la banda de mayor intensidad fue la de 1380 cm^{-1} , seguida por la de 1010 cm^{-1} , la cual fue perfectamente definida, mientras que las demás bandas se insinuaron débilmente. Al conducir la reacción a 700°C , la banda a 1380 cm^{-1} siguió siendo importante, crecieron las que aparecen a 1580 y 2930 cm^{-1} y desapareció la de 1010 cm^{-1} . Considerando el análisis y las asignaciones discutidas para los catalizadores con Co, se propuso que al aumentar la temperatura del reformado en fase gas del glicerol, el depósito carbonoso formado a 500°C presentó características olefínicas mientras que cuando la reacción fue a 700°C el depósito carbonoso cambió siendo su naturaleza principalmente aromática. Similar análisis y conclusión se obtuvo con los catalizadores con Co; esto indica que la naturaleza del depósito carbonoso es similar en ambos tipos de materiales, difiriendo el comportamiento cuantitativo.

Los patrones de DRX correspondientes a $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $5\text{Ni}-2\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$, $5\text{Ni}-4\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ y $5\text{Ni}-6\text{Ce}/\text{Al}_2\text{O}_3$ luego de la reacción (**Figuras 4.13.2c** y **d**) mostraron la presencia de picos definidos y característicos de carbón a 25 y 54° , siendo poco evidente la presencia del pico a 43° ; los picos citados han sido relacionados a carbono gráfico (Rajarao y Bhat., 2012; Li y col., 2008). Los picos identificados concuerdan con lo analizado para los catalizadores de Co, por lo que las asignaciones allí presentadas son aplicables a los materiales con Ce. Al aumentar la temperatura de reacción a 700°C , los picos fueron menores respecto de los observados a 500°C , este comportamiento se explicó sugiriendo que los precursores del depósito carbonoso podrían ser más fácilmente removidos de la superficie al incrementar la temperatura (Blesa y col., 2012). Además, los perfiles a 700°C mostraron que los picos de carbón fueron menores a medida que aumentó la carga de Ce; esto permitió demostrar la eficiencia del CeO_2 por la mayor movilidad de O_2 por la red estructural

del soporte y la promoción de la oxidación del carbón depositado a través de la gasificación (Lin y col., 2012; Alberton y col., 2007).

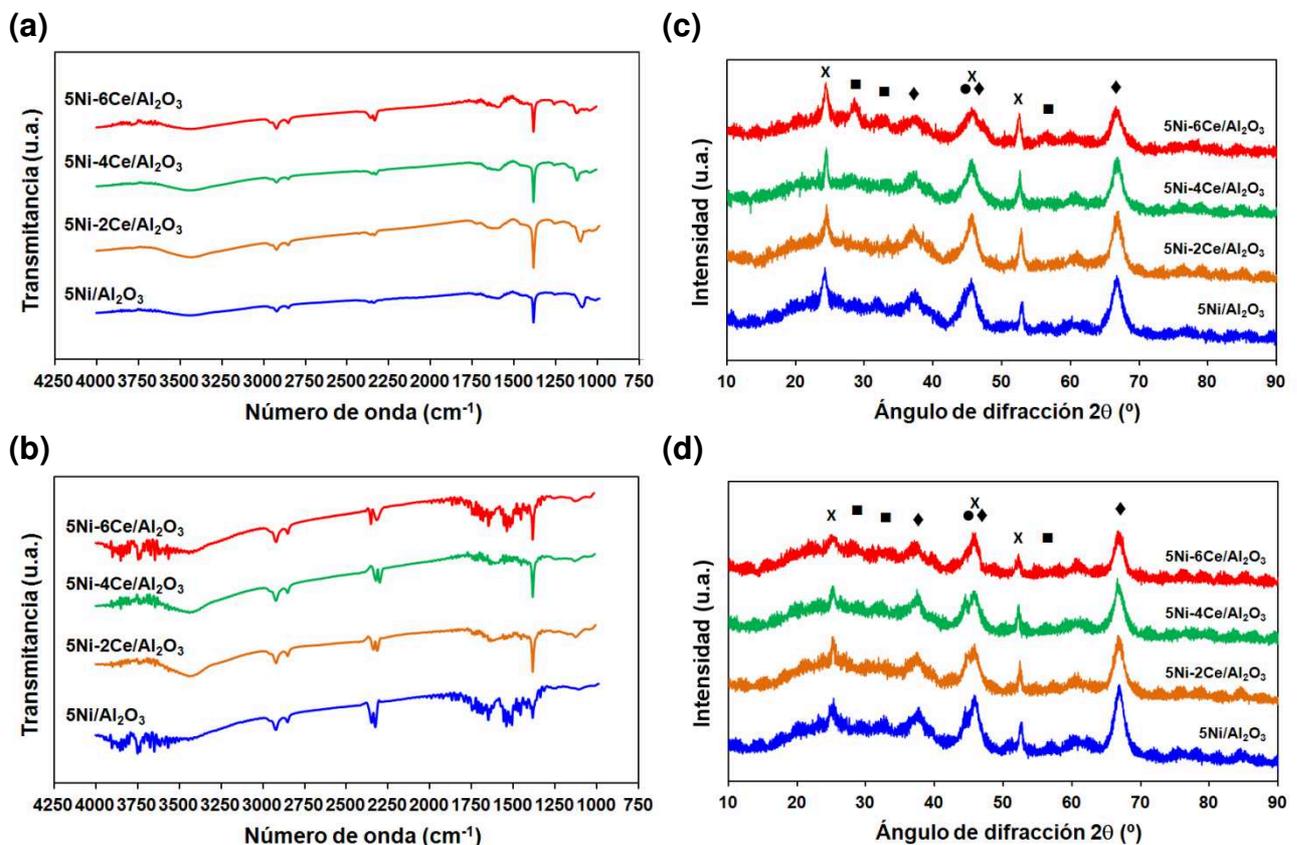


Figura 4.13.2: Espectros de FTIR (izquierda) y patrones de DRX (derecha) obtenidos para los catalizadores 5Ni/Al₂O₃, 5Ni-2Ce/Al₂O₃, 5Ni-4Ce/Al₂O₃ y 5Ni-6Ce/Al₂O₃ luego de la reacción de reformado en fase gas de glicerol a 500°C (a) y (c), y 700°C (b) y (d). ♦: NiAl₂O₄ y γ-Al₂O₃; ●: NiO; ■: CeO₂. X: Carbón.

4.1.3 Evaluación catalítica durante actividad prolongada

4.1.3.1 Experiencias de desactivación

4.1.3.1.1 Distribución de productos

Para la primera experiencia, las fracciones de gases mayoritarios (H₂, CO₂, CO y CH₄) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes son presentadas en la **Figura 4.14**. Al alimentar una solución acuosa de GP al sistema de reacción (**Fig. 4.14a**), las fracciones H₂ y CO₂ disminuyeron con el tiempo, mientras que CO y CH₄ se incrementaron. La fracción H₂ disminuyó de 60 al 46 % en 12 h, mientras que la de CO₂ fue desde 18 a 9%; las fracciones CO y CH₄ aumentaron de manera constante hasta 35 y 11% a 12 h,

respectivamente. Cuando se alimentó una solución acuosa de GC al sistema (**Fig. 4.14b**), el comportamiento fue bastante similar respecto al encontrado con la solución de GP. La fracción H_2 disminuyó de 62 al 47% en 12 h, mientras que la de CO_2 llegó hasta 10%, mientras que las fracciones CO y CH_4 aumentaron hasta 30 y 10%, respectivamente. La fracción CO fue algo superior y la de CO_2 inferior al alimentar GP respecto de GC, lo cual podría asociarse a la presencia de impurezas en el GC provenientes del proceso de obtención de biodiesel (Sundari y col., 2012). Sin embargo, las mínimas diferencias encontradas para ambos reactivos indicaron que, aún en las condiciones desactivantes utilizadas (baja RMAG y mayor VEMH) la utilización de glicerol proveniente de la industria del biodiesel y sin tratamiento previo fue factible para ser directamente empleado en su transformación hacia H_2 .

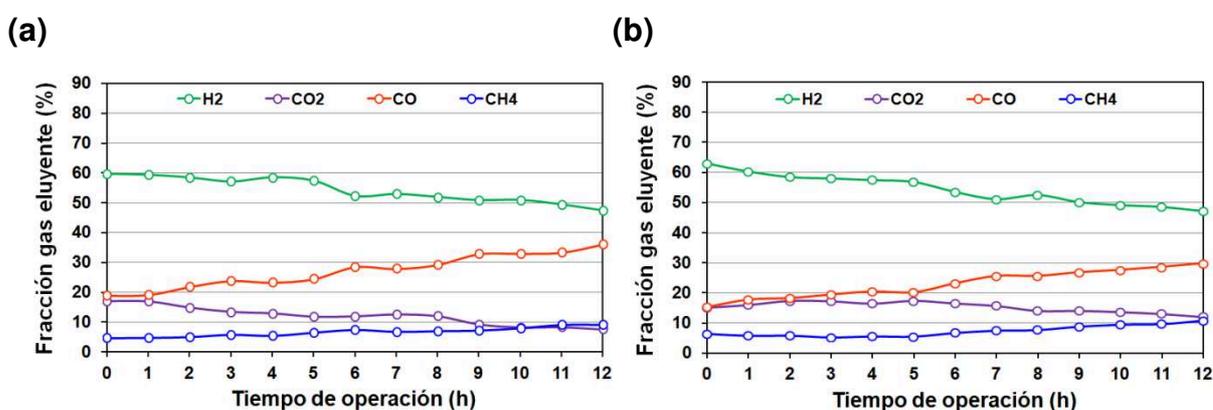


Figura 4.14: Fracciones mayoritarias de gases (H_2 , CO_2 , CO y CH_4) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes, alimentando glicerol puro (a) y glicerol crudo (b).

Para la segunda experiencia, las fracciones de gases mayoritarios (H_2 , CO_2 , CO y CH_4) obtenidas con $5Ni/Al_2O_3$, utilizando las condiciones desactivantes, son presentadas en la **Figura 4.15**. Durante el primer ciclo de reacción (**Fig. 4.15a**), las fracciones H_2 y CO_2 aumentaron suavemente o se mantuvieron constantes en las primeras horas, para luego disminuir lentamente con el tiempo de reacción; la fracción CO mostró un suave descenso hasta la hora 3, mientras CH_4 aumentó suavemente al incrementar el tiempo de operación. El comportamiento inicial podría asociarse al tiempo que necesitó el catalizador hasta llegar al régimen de actividad, comenzando luego a disminuir su actividad por ensuciamiento y bloqueo parcial de sitios activos de reacción (menor disponibilidad) debido a reacciones de formación de depósito carbonoso (**Ecs. 2.37 y 2.38**) (Zhou y col., 2008; Foo y col., 2012). Además, se incrementaron las reacciones que permitieron la generación de CH_4 a

expensas del consumo de parte del H_2 formado (**Ec. 2.24**). Al inicio del segundo ciclo de reacción (**Fig. 4.15b**), la fracción H_2 alcanzó valores mayores que los del inicio del primer ciclo, disminuyendo luego de forma continua y alcanzando valores similares a los del primer ciclo, mientras que la fracción CO_2 se incrementó respecto al ciclo anterior, alcanzando un máximo a 6 h; las fracciones CO y CH_4 aumentan con el tiempo de operación, siendo algo menores que las presentes durante el primer ciclo de reacción. El comportamiento durante el segundo ciclo de reacción demostró que la regeneración fue efectiva y que además fue posible recuperar la actividad catalítica luego de 12 h de operación, aun manteniendo las condiciones desactivantes.

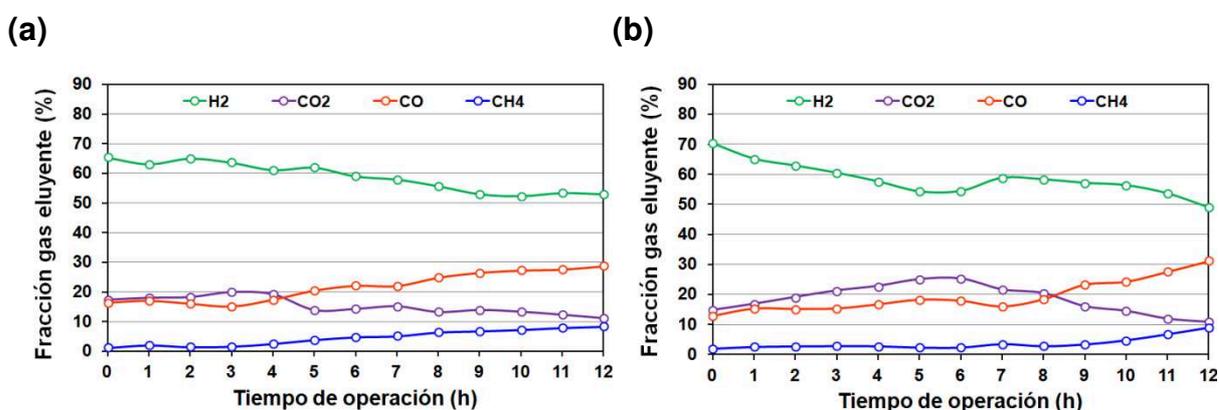


Figura 4.15: Fracciones mayoritarias de gases (H_2 , CO_2 , CO y CH_4) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes, durante el primer ciclo (a) y segundo ciclo de reacción (b).

Para la tercera experiencia, las fracciones de gases mayoritarios (H_2 , CO_2 , CO y CH_4) obtenidas durante la reacción con $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes son presentadas en la **Figura 4.16**. Durante el primer ciclo (**Fig. 4.16a**) la fracción H_2 aumentó suavemente durante las primeras 5 h hasta 75%, pero luego disminuyó con el tiempo de operación hasta 50% a 12 h. Este comportamiento fue similar al encontrado en el primer ciclo del segundo ensayo, donde se relacionó la disminución de la fracción H_2 con la menor disponibilidad de sitios activos en el catalizador por formación de depósito carbonoso y la presencia de reacciones que estimulan la formación de CH_4 a expensas del H_2 formado. La fracción CO se mantuvo relativamente constante hasta 7 h y luego aumentó de manera marcada hasta 12 h, con comportamiento muy similar al CH_4 , el cual se mantuvo en valores bajos las primeras 6 h y luego aumentó hasta las 12 h, llegando al 10%. La fracción CO_2 fue prácticamente la misma (23%) durante toda esta etapa. Al inicio del segundo ciclo (**Fig. 4.16b**), la fracción H_2 fue mayor que al inicio del primer ciclo, lo

que indicó que la regeneración realizada luego de 12 h de reacción fue eficiente. Sin embargo, esta fracción disminuyó más rápidamente durante las segundas 12 h de reacción. La fracción CO se incrementó marcadamente durante este ciclo, mientras que la de CO₂ disminuyó hasta 14% a 12 h. La menor cantidad inicial de CH₄ detectada (3%) también demostró que inicialmente se logró recuperar la actividad catalítica, aunque luego la fracción de este gas aumentó hasta 10%. El incremento en la fracción de CO posiblemente sea debido a reacciones entre los gases generados y el depósito carbonoso presente en el catalizador (**Ec. 2.39**), eliminando parte del carbón formando para generar CO y CH₄, o consumiendo CO₂ y carbón para generar CO (**Ec. 2.36**).

En el tercer ciclo (**Fig. 4.16c**) se evidenció que la segunda regeneración no fue tan efectiva como la primera, pues aunque la fracción inicial de H₂ fue parecida a la del primer ciclo, el comportamiento con el tiempo de operación fue similar al segundo ciclo. Además, la fracción inicial de CH₄ durante este ciclo fue superior que para los ciclos 1 y 2, lo que indicó una regeneración menos eficiente. Las fracciones de CO y CO₂ fueron similares a la del segundo ciclo, llegando a 42 y 16% a 12h, respectivamente. Para el cuarto ciclo (**Fig. 4.16d**), fue observado que la tercera regeneración permitió recuperar la actividad inicial, pero luego de la hora 3 la fracción H₂ disminuyó drásticamente hasta 34%, llegando a 31% a 12 h de operación. La fracción CO aumentó rápidamente durante el tiempo de reacción, alcanzando 45% a tiempo final, mientras que la fracción de CO₂ fue bastante similar a la del ciclo 3. La fracción inicial de CH₄ nuevamente presentó valores superiores a los de los restantes ciclos, y aumentó hacia las 12 h. Fue evidente la disminución de la actividad del catalizador por inactivación de los sitios metálicos activos mediante reacciones de formación de carbón (**Ec. 2.37 y 2.38**), así como sinterización (Soares y col., 2006). Estos depósitos fueron producto de reacciones de deshidratación, craqueo y polimerización sobre los sitios ácidos de la Al₂O₃, mientras que el sinterizado de las partículas metálicas fue debido a la limitada resistencia térmica del soporte (Ni y col., 2007; Seo y col., 2009). A medida que fueron incrementados los ciclos de operación, las regeneraciones lograron recuperar cada vez menos la actividad inicial, generando mayores fracciones de CO y CH₄, y provocando una leve disminución en la fracción CO₂ pero una disminución bastante superior para la fracción H₂, entre 36 y 48 h de operación.

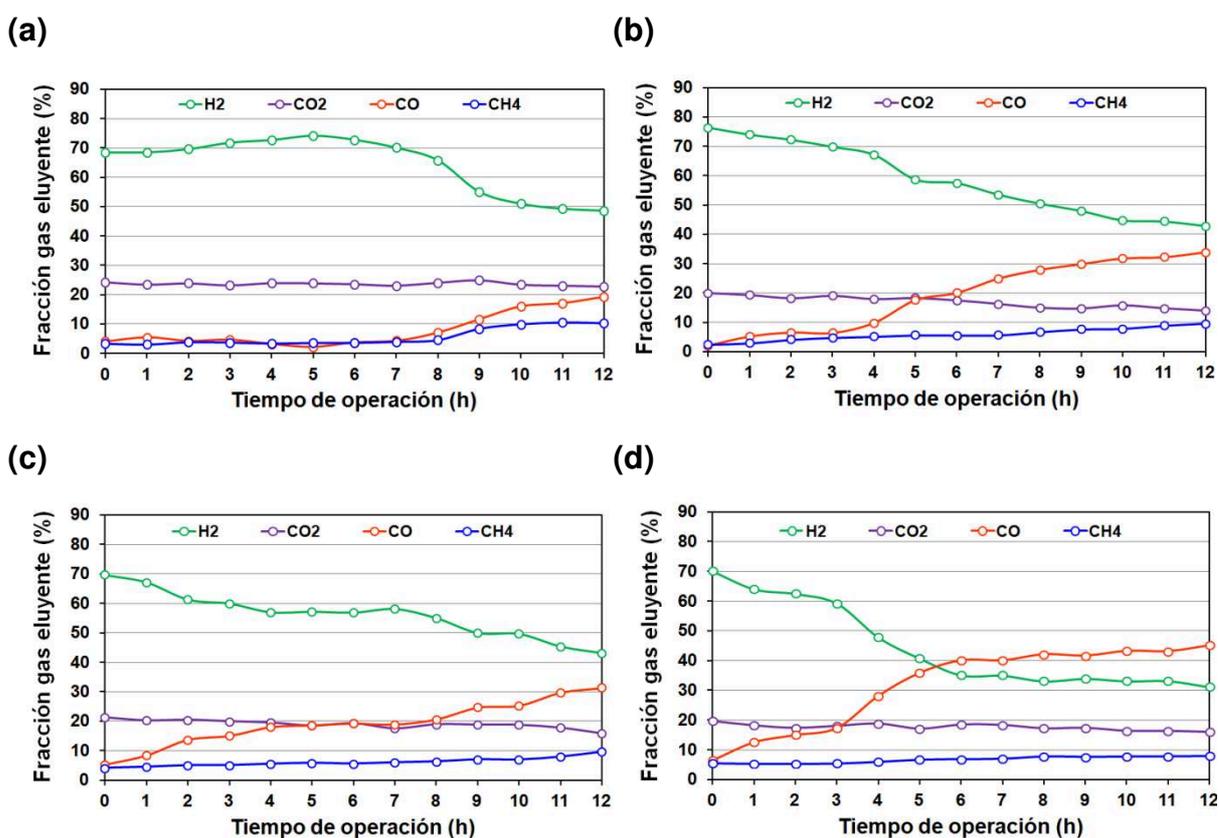


Figura 4.16: Fracciones mayoritarias de gases (H₂, CO₂, CO y CH₄) obtenidas durante el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes, durante el primer (a), segundo (b), tercer (c) y cuarto ciclo de reacción (d).

Las fracciones mayoritarias de productos líquidos en el reformado en fase gas del glicerol con 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes y para 4 ciclos de operación de 12 h, son presentadas en la **Figura 4.17**. Durante el primer ciclo (**Fig. 4.17a**), los principales productos fueron MeAL y 2-HEtAL, los cuales disminuyeron al aumentar el tiempo de reacción; la concentración total de estos productos fue baja, 2,4 y 1,1 g L⁻¹, respectivamente. Los mismos compuestos fueron obtenidos con el mismo catalizador a 700°C en condiciones no desactivantes, siendo el primero de ellos generado por deshidratación del glicerol con la co-producción de EtAL en una única etapa (Nimlos y col, 2006), mientras que segundo fue obtenido mediante una reacción de deshidrogenación de 1,2-EtDOL (King y col., 2010).

Al evaluar el segundo ciclo, (**Fig. 4.17b**) el comportamiento fue similar respecto al primer ciclo, disminuyendo la concentración de los productos con el tiempo de operación; sin embargo también fueron formados otros compuestos a mayor concentración, siendo los principales Ac y 1,2-EtDOL, a concentraciones finales de 36,9 y 11,5 g L⁻¹, respectivamente. El tercer ciclo (**Fig. 4.17c**) tuvo comportamiento cualitativo similar al anterior, siendo los productos líquidos más importantes Ac y

1,2-EtDOL, con 34,6 y 26,8 g L⁻¹, respectivamente. La Ac fue obtenida por deshidratación de la MHA, que a su vez fue generada a partir de la deshidratación del glicerol (Trimm, 1999; Bartholomew, 1982). El compuesto 1,2-EtDOL fue generado a partir de otro mecanismo de reacción, en el cual el glicerol fue deshidrogenado para generar 2,3-DHPAL, y éste fue decarbonilado para generar el 1,2-EtDOL (King y col., 2010). Finalmente, en el cuarto ciclo (Fig. 4.17d) se repitió

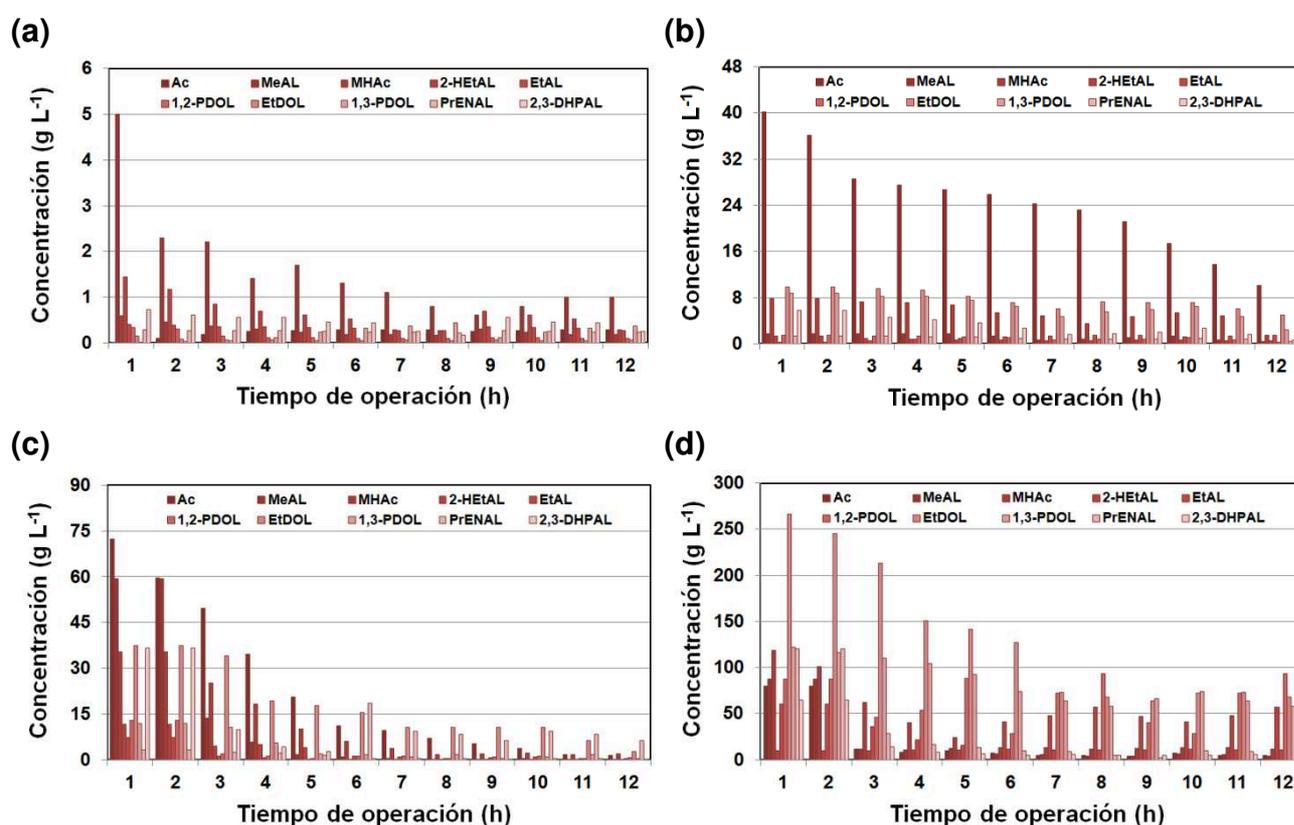


Figura 4.17: Fracciones mayoritarias de compuestos líquidos, obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol con 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes, durante el primer (a), segundo (b), tercero (c) y cuarto ciclo de reacción (d).

el comportamiento cualitativo con el tiempo, obteniendo 1,2-EtDOL y 1,3-PDOL como productos más importantes, con 195,4 y 125,4 g L⁻¹, respectivamente. La identificación del 1,3-PDOL en los compuestos líquidos indicó que la reacción comenzó a generar compuestos que anteriormente eran identificados en muy bajas proporciones, y en lugar de priorizar las reacciones de deshidratación, fueron llevadas a cabo otras reacciones que consumen el H₂ formado, siendo evidente en la Figura 4.16d (Araque y col., 2012). Además, fueron generados otros productos entre las 36 y 48 h (ciclo de reacción 4) junto con mayores concentraciones de los mismos, con valores 5 veces superiores a los identificados durante el ciclo 3.

4.1.3.1.2 Parámetros obtenidos

La conversión de glicerol obtenida a 6 y 12 h de reacción para cada ciclo, y los parámetros X_T , X_G , X_L y R_{GS} obtenidos en el reformado en fase gas de glicerol para $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones extremas de reacción que favorecen la desactivación son presentados en la **Tabla 4.10**. En el ciclo 1, la conversión fue completa (100%), independiente del tiempo de operación. Para los ciclos 2, 3 y 4, la conversión disminuye al aumentar el tiempo de operación y también al ir avanzando en el número de ciclo, alcanzando X_T 86,0; 76,8 y 70,6%, respectivamente e indicando una marcada desactivación del catalizador en función de ambos parámetros (tiempo de operación y ciclos de reacción). X_G y X_L también disminuyeron a medida que se repiten los ciclos de reacción. Los valores de depósito carbonoso formado fueron cercanos a 0,9%C referido al glicerol alimentado. La disminución de actividad de los catalizadores ha sido relacionada a reacciones de deshidratación, craqueo y polimerización, así como a la sinterización del material (Ni y col., 2007; Seo y col., 2009; Soares y col., 2006).

Tabla 4.10: Conversiones (%) obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol para el catalizador $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes.

CICLO	Conversiones (%)				
	6 h	12 h	X_T	X_G	X_L
1	100,0	100,0	100,0	63,4	36,6
2	90,0	69,7	86,0	51,3	34,7
3	70,7	62,8	76,8	44,7	32,1
4	61,9	51,6	70,6	40,7	29,9

Los valores de selectividades (S_{H_2} y S_C) y rendimientos (Y_{H_2} y Y_C) a principales productos obtenidos en el reformado en fase gas de glicerol para $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes son presentados en las **Tablas 4.11** y **4.12**. La S_{H_2} y Y_{H_2} durante el primer ciclo fueron similares a los encontrados para el mismo material durante el ensayo en condiciones no desactivantes, a 700°C y 8 h de operación (**Tablas 4.8** y **4.9**), mientras que los Y_{CO_2} , Y_{CH_4} e Y_{C_2} fueron mayores durante el primer ciclo que los reportados a 8 h. Para los ciclos 2, 3 y 4, las selectividades y rendimientos fueron cada vez menores para H_2 , CO_2 y CH_4 , con un notable incremento para CO , C_2 y compuestos de mayor número de átomos de carbono. La

disminución en el Y_{H_2} fue acompañado por una disminución en la conversión hacia productos gaseosos, lo que indicó una progresiva desactivación del catalizador con el tiempo de operación (Araque y col., 2011). Con el aumento del tiempo de operación se produjo mayor cantidad de CO, la que estuvo favorecida por la reacción de descomposición de glicerol (**Ec. 2.22**) (Wang y col., 2010). Además, la cantidad de CH_4 también aumentó, siendo posiblemente generada por la eliminación parcial del carbón con consumo del H_2 formado (inversa de la **Ec. 2.34**) (Cheng y col., 2010a) o mediante la reacción de hidrogenación del CO_2 (**Ec. 2.24**). Esto demostró una importante desactivación del catalizador con el incremento del tiempo de reacción, generando menor cantidad de productos gaseosos y mayor de compuestos líquidos (Araque y col., 2012).

Tabla 4.11: Selectividades a principales productos (%) obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol para el catalizador $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes.

CICLO	Selectividades (%)								
	H_2	CO_2	CH_4	CO	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
1	76,2	70,9	11,4	12,9	4,3	0,4	0,0	0,1	0,0
2	70,8	44,7	12,6	37,0	5,0	0,5	0,0	0,1	0,0
3	66,1	40,4	11,6	34,6	12,0	1,2	0,1	0,1	0,0
4	49,7	22,5	7,9	35,9	26,9	5,0	0,7	1,0	0,1

Tabla 4.12: Rendimientos a principales productos (%) obtenidas en el reformado en fase gas de glicerol para el catalizador $5Ni/Al_2O_3$ en condiciones desactivantes.

CICLO	Rendimientos (%)								
	H_2	CO_2	CH_4	CO	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
1	76,0	69,9	11,2	12,8	4,3	0,4	0,0	0,1	0,0
2	60,7	39,6	11,2	32,8	4,5	0,4	0,0	0,1	0,0
3	41,5	26,1	7,5	22,4	7,8	0,8	0,1	0,0	0,0
4	23,8	11,0	3,9	17,6	13,2	2,5	0,3	0,5	0,1

4.1.3.1.3 Depósitos de carbón

Los perfiles de OTP y las concentraciones de carbón a 12, 24 y 48 h, para 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes se presentan en la **Figura 4.18**. Los perfiles de OTP (**Fig. 4.18a**) mostraron oxidación de depósitos de carbón formados desde 260-300 °C hasta 500 °C con crecimiento suave, apareciendo luego un pico intenso con máximo en 720-740 °C. Los perfiles permitieron considerar que la naturaleza del carbón generado fue principalmente grafitico (banda ancha a mayor temperatura), y baja generación de carbón amorfo (banda suave a baja temperatura) (Bartholomew y col., 2001; Noronha y col., 2001). Estas especies fueron principalmente formadas debido a la utilización de altas temperaturas en el reformado en fase gas, junto con prolongados tiempos de reacción y una relación molar menor (Hardiman, 2007).

Respecto a las concentraciones de carbón, la cantidad generada durante las primeras 12 h de reacción fue 22,2 mg C gcat⁻¹ h⁻¹, superior que en condiciones no desactivantes (16,2 mg C gcat⁻¹ h⁻¹, **Fig. 4.13c**). A 24 h de operación la cantidad de carbón fue 41,1 mg C gcat⁻¹ h⁻¹, casi el doble que la generada a 12 h, mientras que a 48 h fue 38,6 mg C gcat⁻¹ h⁻¹, siendo algo menor que a 24 h. Esto posiblemente se asoció a que la segunda o tercera regeneración fueron más adecuadas que la primera, o bien durante el tercer o cuarto ciclo de reacción la producción de carbón fue mucho menor que al inicio de la reacción. La formación de carbón se asoció al grado de movilidad de O₂ por parte del soporte (Srisiriwat y col, 2009), mientras que otros autores la han relacionado con el grado de acidez del soporte (Adhikari y col., 2008a). Por lo tanto, la elevada formación de carbón sobre el catalizador utilizado en el proceso de desactivación fue directamente relacionado a la baja movilidad de O₂ y a la elevada acidez presente en el soporte γ -Al₂O₃ (Manfro y col., 2013).

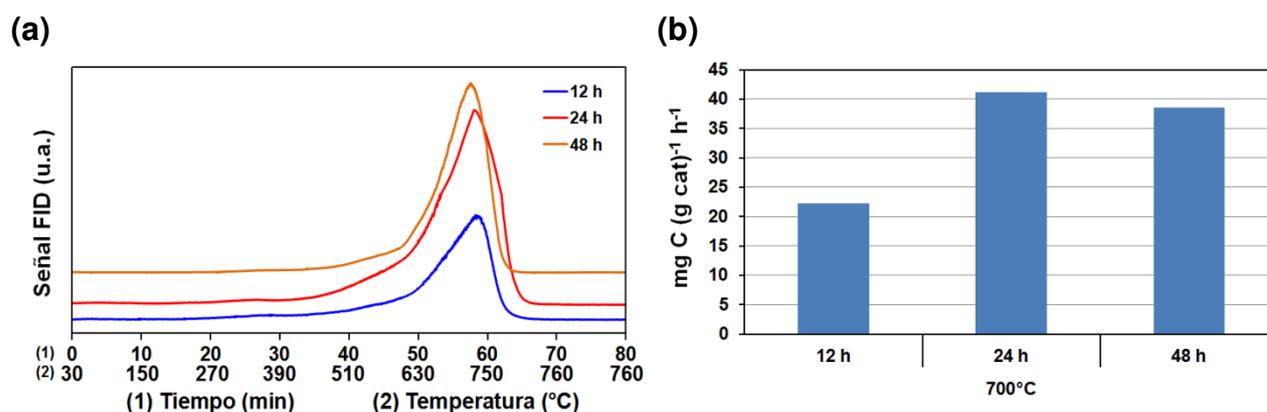


Figura 4.18: Perfiles OTP a diferentes tiempos de operación en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes **(a)** y concentraciones finales de carbón **(b)**.

4.1.3.2 Ensayos de regeneración

Los perfiles de regeneración, obtenidos durante los ensayos de desactivación a 24 y 48 h, utilizando el catalizador $5\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$ en condiciones desactivantes, son mostrados en la **Figura 4.19**. En los perfiles de regeneración obtenidos durante el ensayo 2, de 24 h de duración (**Fig. 4.19a**), el consumo de O_2 presentó picos bien definidos alrededor de 630°C , lo cual indicó que existe eliminación del carbón presente en el catalizador. Pudo observarse que el consumo de O_2 fue superior en la primera regeneración que durante la segunda, lo cual indicó que la remoción fue más fácilmente realizada luego de la segunda etapa de reacción. Sin embargo, fue detectado un leve consumo de O_2 cuando el sistema alcanzó los 760°C y operó isotérmico, indicando la presencia de ciertas cantidades de carbón que no pudieron ser eliminadas aún a temperatura elevada, y permanecen en el catalizador durante las etapas sucesivas. Estos resultados fueron comparables a los reportados, donde catalizadores regenerados luego de un proceso de desactivación demostraron una recuperación del 90% en la actividad catalítica (Cheng y col, 2010b).

Respecto a los perfiles obtenidos durante el ensayo 3, de 48 h de duración (**Fig. 4.19b**), el consumo de O_2 mostró picos bien definidos alrededor de 670°C , lo cual demostró que el carbón generado fue algo más difícil de eliminar, debido al desplazamiento del máximo del pico principal hacia mayor temperatura. El consumo de O_2 para la primera regeneración fue superior que para la segunda, mientras que la tercera regeneración fue algo inferior que la primera. Además, en todos los perfiles, nuevamente fue observado un consumo de O_2 cuando el sistema alcanzó los 760°C y opera isotérmico, siendo mucho más importante durante la tercera regeneración. El éxito de la operación de regeneración dependerá de los métodos y condiciones utilizadas, siendo el factor más importante la temperatura (Wang y col., 2013-3562). Sin embargo, aunque el proceso de regeneración fue realizado a elevada temperatura, adecuada concentración de O_2 y durante tiempo prolongado, la cantidad de carbón remanente no pudo ser removida del catalizador. Este carbón no eliminado durante las etapas de regeneración facilitaría la deposición de mayor cantidad de carbón en las siguientes etapas de reacción, pues las concentraciones de carbón detectadas (**Fig. 4.18b**) mostraron una mayor cantidad a 24 h ($41,1 \text{ mg C gcat}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que a 12 h ($22,2 \text{ mg C gcat}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Por otro lado, debido a que la tercer regeneración fue más eficiente que la segunda, la concentración de carbón a 48 h

($38,6 \text{ mg C gcat}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue apenas inferior que la observada a 24 h, aunque continuó siendo elevada y fue la causante de la disminución de la actividad catalítica con el tiempo de reacción. Fue probable que el carbón que no pudo ser eliminado durante la regeneración se encuentre fuertemente adsorbido en el soporte, y afecte la actividad de los sitios metálicos activos de manera más intensa que el carbón eliminado en la regeneración (De Lima y col., 2009). Como fue requerida elevada temperatura durante la eliminación parcial de los depósitos de carbón, la naturaleza del mismo corresponde principalmente al tipo grafitico (especies adsorbidas sobre el soporte), con menor presencia del tipo amorfo a menor temperatura (especies adsorbidas cerca de las partículas metálicas) (Araque y col., 2011).

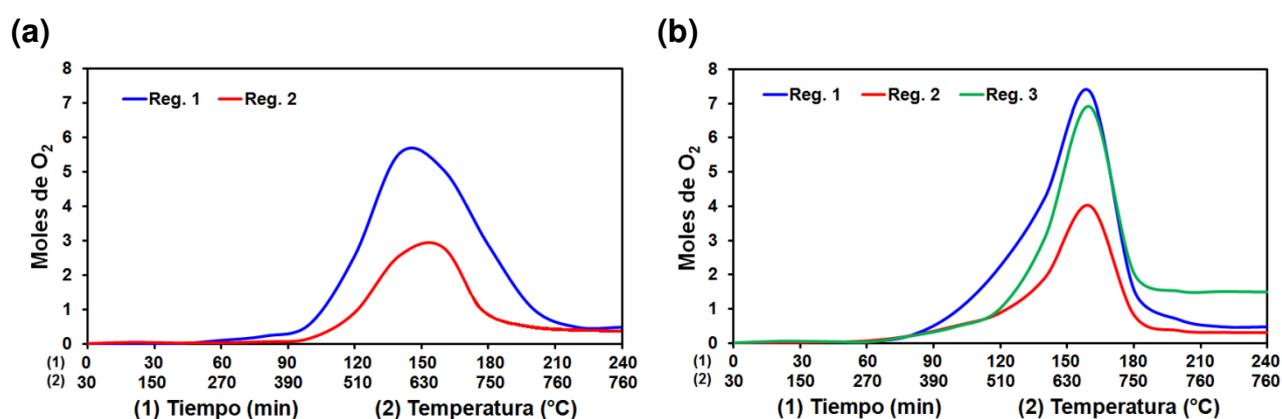


Figura 4.19: Perfiles de consumo de O₂ en el reformado en fase gas de glicerol para 5Ni/Al₂O₃ en condiciones desactivantes a 24 h (a) y 48 h (b) de operación.

4.2 Sistemas biológicos

4.2.1 Caracterización de las cepas de *E. coli*

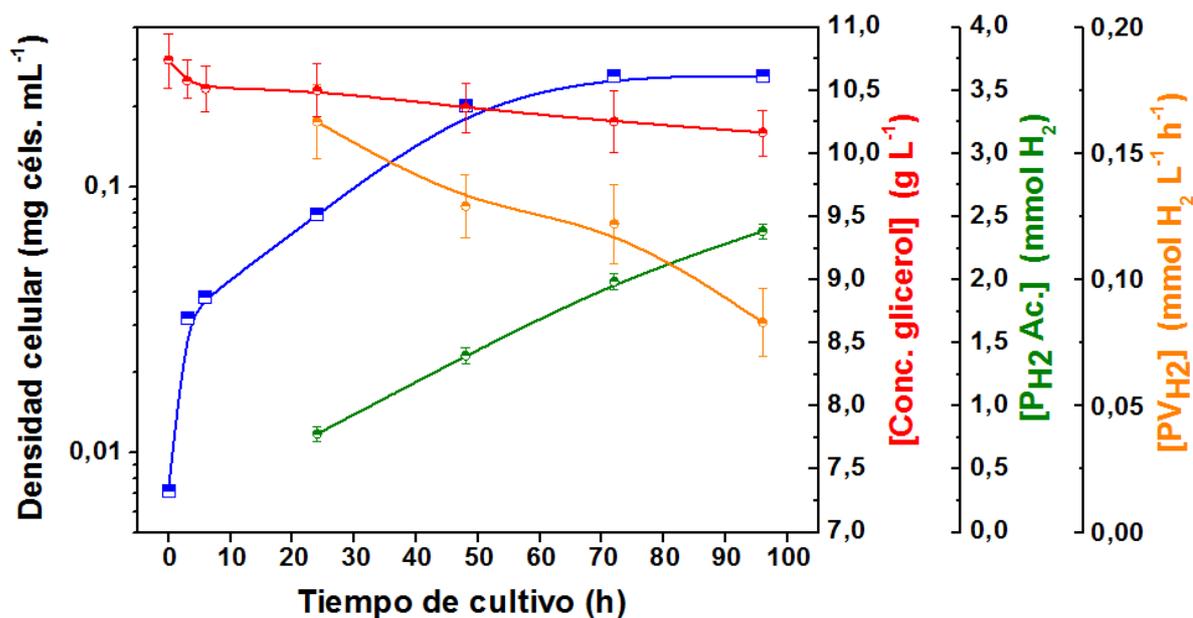
Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las cepas C_{CON} y C_{HW2} durante el proceso de fermentación, fueron empleados los medios M1, M2 y M3. Los resultados se muestran en las **Figuras 4.20, 4.21 y 4.22**, respectivamente.

Los ensayos realizados utilizando el medio M1 y empleando la cepa C_{CON} (**Fig. 4.20a**), demostraron un crecimiento celular exponencial hasta las 3 h, fase que se caracterizó por una μ de $0,26 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. Este valor de μ difiere del previamente reportado ($0,05 \text{ h}^{-1}$) por Hu y Wood (2010) para la misma cepa crecida en un medio de cultivo idéntico al utilizado en este trabajo. También supera al determinado por otros autores ($0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) cuando se empleó un medio glicerol mínimo modificado con el agregado de TT y EL (Sanchez-Torres y col., 2013; Murarka y col., 2008). Las diferencias entre el valor obtenido y los reportados podrían deberse a la utilización de una menor temperatura durante el ensayo. Por otra parte, la X_{max} obtenida fue de $0,26 \pm 0,01 \text{ mg células mL}^{-1}$. Puede apreciarse un lento consumo del glicerol agregado al medio, el cual fue de $(5,94 \pm 1,7) \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La P_{H_2} alcanzó $2,39 \pm 0,06 \text{ mmol H}_2$, y la PV_{H_2} decrece con el tiempo de cultivo, siendo mayor a 24 h de ensayo con valor de $0,16 \pm 0,02 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Este valor fue 26% mayor que los $0,127 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ informados previamente (Hu y Wood, 2010) a 24 h para la misma cepa de *E. coli* crecida en un medio de cultivo idéntico al utilizado y con igual cantidad de glicerol inicial, así como el valor reportado de $0,125 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Dimanta y col., 2013) para C_{CON} crecida en un medio de cultivo diferente y con agregado de glicerol (Penfold y col., 2003; Maeda y col., 2008). Los rendimientos obtenidos para la cepa C_{CON} fueron de $0,10 \pm 0,01$, $0,04 \pm 0,01$ y $0,45 \pm 0,02 \text{ g g}^{-1}$, para $Y_{H_2/X}$, $Y_{H_2/G}$ y $Y_{X/G}$, respectivamente.

Al utilizar el medio M1 y la cepa C_{HW2} (**Fig. 4.20b**), el cultivo presentó una fase de crecimiento celular exponencial hasta las 6 h, y se caracterizó por una μ de $0,29 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. En este caso, el valor de μ estuvo cercano al valor $0,25 \text{ h}^{-1}$ reportado en un estudio previo (Hu y Wood, 2010), obtenido para la misma cepa crecida en un medio de cultivo idéntico al utilizado en el laboratorio e idéntica concentración de glicerol. Para esta cepa, fue determinada una X_{max} de $0,36 \pm 0,01 \text{ mg células mL}^{-1}$. Fue observado que la cepa C_{HW2} presentó un Q_{gli} 5 veces mayor respecto de la C_{CON} , con un valor de $(2,99 \pm 0,31) \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La P_{H_2} fue de $8,60 \pm 0,06 \text{ mmol H}_2$, y la PV_{H_2} decrece con el tiempo de cultivo, alcanzando el mayor valor registrado

a 24 h de ensayo, el cual fue $0,78 \pm 0,03 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nuevamente, este valor fue 15% superior que $0,68 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ reportado en un análisis previo (Hu y Wood, 2010) a 24 h y para la misma cepa de *E. coli* crecida en un medio de cultivo idéntico al utilizado y con igual cantidad de glicerol inicial. Para esta cepa, los rendimientos obtenidos fueron de $0,25 \pm 0,03$, $0,03 \pm 0,01$ y $0,12 \pm 0,01 \text{ g g}^{-1}$, para $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$, $Y_{\text{H}_2/\text{G}}$ y $Y_{\text{X}/\text{G}}$, respectivamente.

(a)



(b)

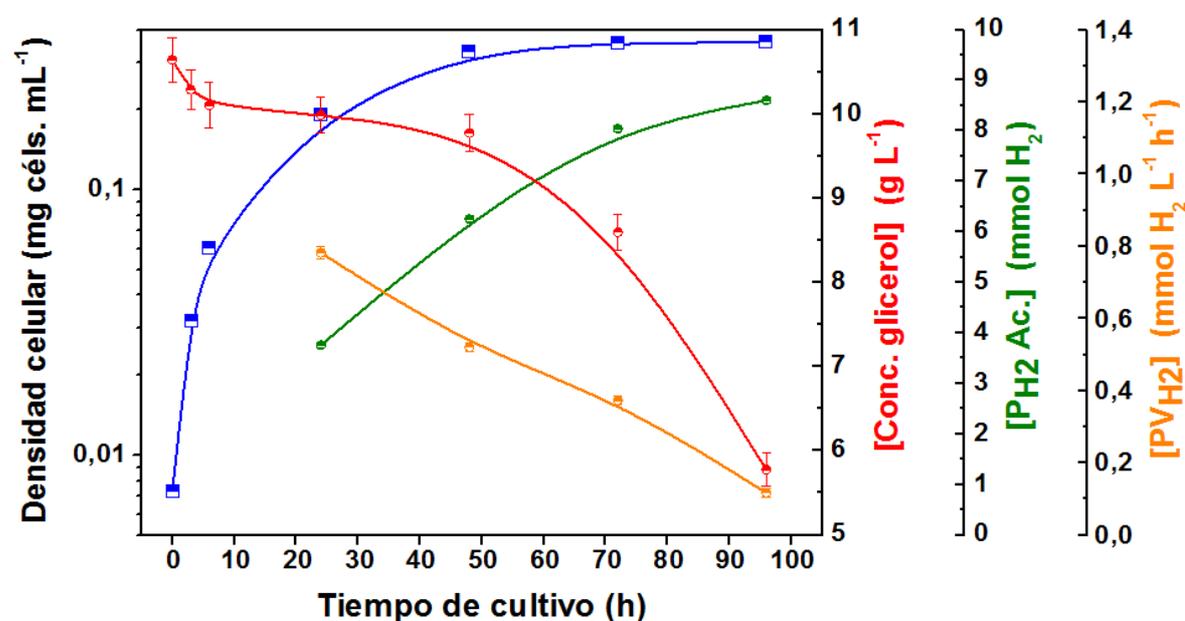


Figura 4.20: Evolución de la densidad celular y de la concentración de glicerol, producción de H₂ y productividad de H₂, en función del tiempo de cultivo, para las cepas de *E. coli* C_{CON} (a) y C_{HW2} (b) utilizando el medio M1. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada.

Los ensayos en los cuales fueron utilizados el medio M2 y la cepa C_{CON} (**Fig. 4.21a**), mostraron un crecimiento celular exponencial hasta las 6 h, caracterizado por una μ de $0,04 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, siendo un valor muy similar al reportado por Cofré y col. (2012) ($0,03 \text{ h}^{-1}$) para una cepa de *E. coli* MG1655 crecida en un medio idéntico al utilizado en este trabajo y con igual cantidad de glicerol. Además, el valor de μ fue idéntico al determinado previamente (Murarka y col., 2008), donde se empleó una cepa de *E. coli* MG1655 crecida heterotróficamente en un medio idéntico y con igual cantidad de glicerol. El cultivo logró una X_{max} de $0,07 \pm 0,03 \text{ mg células mL}^{-1}$, lo cual indicó un bajo crecimiento celular para este medio. Existe un importante Q_{gli} presente en el medio, el cual fue de $(1,58 \pm 0,21) \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ al final del cultivo. La P_{H_2} presentó valores de $8,44 \pm 0,07 \text{ mmol H}_2$, y la PV_{H_2} generó un máximo a 48 h, siendo $1,00 \pm 0,16 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Debido a que el cultivo reportado por Cofré y col. (2012) fue optimizado para la producción de etanol, no existen datos comparables respecto a la producción de H_2 y productividad a H_2 .

Cuando fue empleado el medio M2 y la cepa C_{HW_2} (**Fig. 4.21b**), el cultivo mostró una fase de crecimiento exponencial hasta las 8-10 h, con una μ de casi el doble de la encontrada para la C_{CON} ($0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). La X_{max} lograda fue del doble que la correspondiente a la C_{CON} ($0,11 \pm 0,04 \text{ mg células mL}^{-1}$). La cepa C_{HW_2} presentó un Q_{gli} 1,4 veces mayor respecto de la C_{CON} , con un valor de $(2,23 \pm 0,29) \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La P_{H_2} duplicó la correspondiente a la C_{CON} ($17,10 \pm 0,15 \text{ mmol H}_2$) y la PV_{H_2} presentó un máximo a 48 h, similar a la C_{CON} , pero siendo tres veces mayor ($1,43 \pm 0,12 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Los rendimientos observados para ambas cepas fueron bajos y similares, siendo de $0,06 \pm 0,01$, $0,07 \pm 0,02$ y $0,04 \pm 0,01 \text{ g g}^{-1}$, para $Y_{H_2/X}$, $Y_{H_2/G}$ y $Y_{X/G}$, respectivamente.

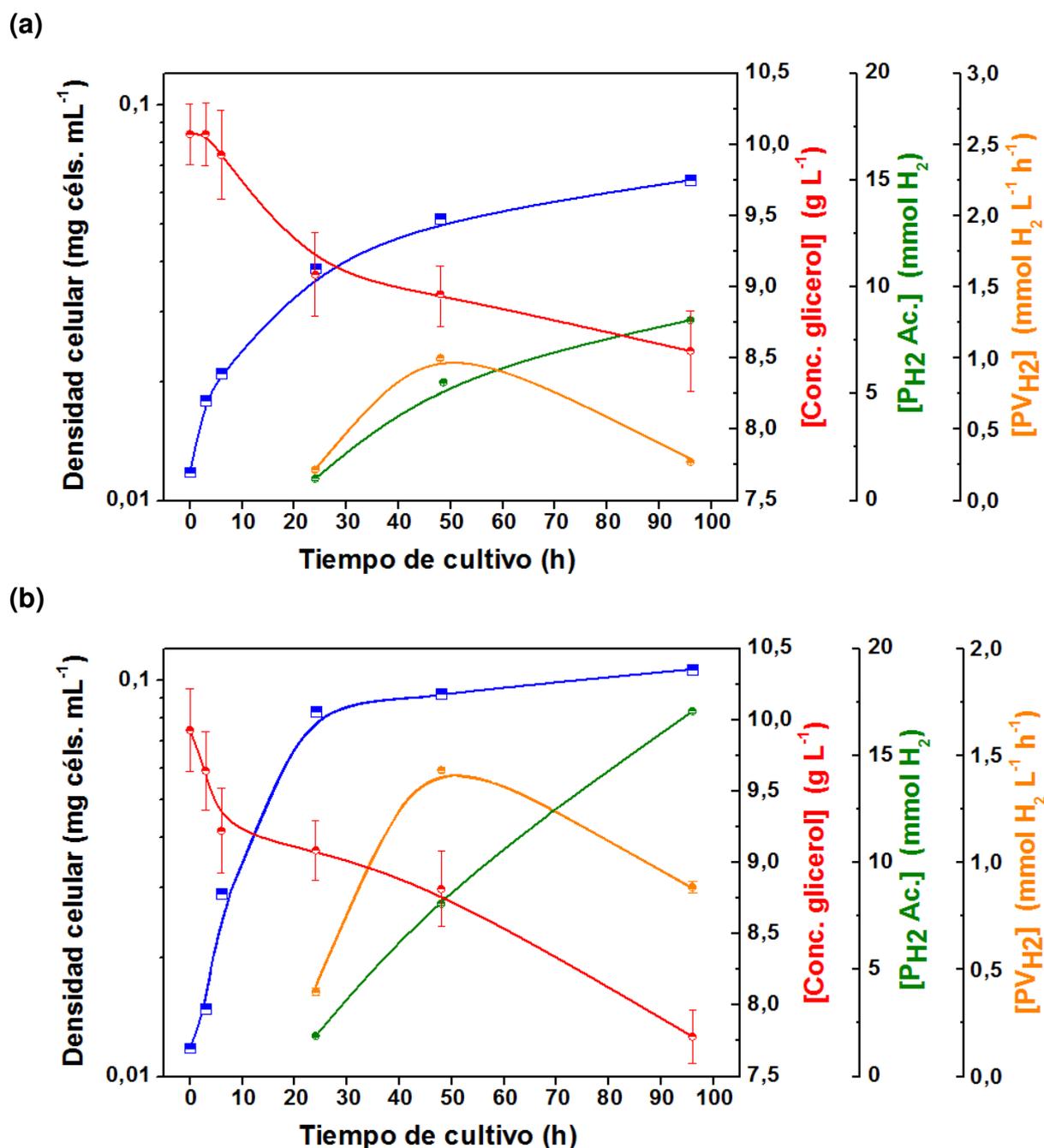


Figura 4.21: Evolución de la densidad celular y de las concentración de glicerol, producción de H_2 y productividad de H_2 , en función del tiempo de cultivo, para las cepas de *E. coli* C_{CON} (a) y C_{HW2} (b) utilizando el medio M2. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada.

En los ensayos realizados utilizando el medio M3 y la cepa C_{CON} (Fig. 4.22a), la etapa de crecimiento celular exponencial llegó hasta las 6 h, con un valor de μ de aproximadamente el doble ($0,45 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$) que la observada para el medio de cultivo M1, y 9 veces superior a la previamente reportada (Hu y Wood, 2010) ($0,05 \text{ h}^{-1}$) para la misma cepa. La X_{max} fue de $0,57 \pm 0,03 \text{ mg células mL}^{-1}$, valor 2 veces superior al obtenido con el medio M1. El Q_{gli} a tiempo final de cultivo fue de ($9,68 \pm$

$1,11) \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La P_{H_2} presentó un valor máximo de $12,10 \pm 0,26 \text{ mmol H}_2$, y la PV_{H_2} generó un máximo a 48 h, siendo $1,10 \pm 0,05 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, valor similar al obtenido a 24 h. Los rendimientos obtenidos para la cepa C_{CON} fueron de $0,22 \pm 0,03$, $0,13 \pm 0,01$ y $0,60 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$, para $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$, $Y_{\text{H}_2/\text{G}}$ y $Y_{\text{X}/\text{G}}$, respectivamente. Para una cepa C_{CON} en un medio de cultivo con glicerol, fue reportado un $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$ de $0,20 \text{ mol mol}^{-1}$ (Suhaimi y col., 2012), valor similar al obtenido con la C_{CON} con el medio M3, pero algo menor a los $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$ reportados para otras cepas recombinantes de *E. coli* SS1 y *E. coli* BL21 (Suhaimi y col., 2012).

Respecto a la utilización del medio M3 y la cepa C_{HW_2} (**Fig. 4.22b**), el cultivo mostró una fase de crecimiento exponencial hasta las 6 h, presentando una μ 12% superior ($0,51 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) que la encontrada para la C_{CON} . La mayor X_{max} de todos los medios de cultivo analizados fue obtenida con C_{HW_2} , siendo $0,66 \pm 0,04 \text{ mg células mL}^{-1}$. La cepa C_{HW_2} presentó un Q_{gli} 1,5 veces mayor respecto de la C_{CON} , siendo $(1,46 \pm 0,11) \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, diferencia similar a la encontrada entre ambas cepas con el medio de cultivo M2. Sin embargo, si se tiene en cuenta el consumo de glicerol entre las 24 y 48 h, puede existir la posibilidad de que la C_{HW_2} haya logrado utilizar todo el glicerol suministrado al medio antes de las 96 h de cultivo. La P_{H_2} producción acumulada de H_2 fue 2,5 veces superior que la correspondiente a la C_{CON} ($29,60 \pm 0,28 \text{ mmol H}_2$) y la PV_{H_2} también presentó un máximo a 48 h de igual manera que para la C_{CON} , pero siendo 2 veces superior ($2,2 \pm 0,03 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Con la cepa C_{HW_2} los rendimientos fueron $0,46 \pm 0,04$, $0,21 \pm 0,02$ y $0,45 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$, para $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$, $Y_{\text{H}_2/\text{G}}$ y $Y_{\text{X}/\text{G}}$, respectivamente.

En función de todos los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en los medios de cultivo analizados, pudo determinarse que la cepa identificada como promisorio para la producción de H_2 a partir del glicerol (C_{HW_2}) presentó un mayor consumo de glicerol y producción acumulada de H_2 que la C_{CON} , así como un crecimiento celular superior para todos los ensayos. Esto demostró que la C_{HW_2} presenta un camino metabólico más eficiente hacia la utilización del glicerol, junto con una notable mejora hacia la producción de H_2 por represión de determinadas vías metabólicas que disminuyen el rendimiento a H_2 . Por otro lado, el medio de cultivo M3 presentó mejores valores de crecimiento celular y de producción de H_2 con la C_{HW_2} , aunque con menor consumo de glicerol respecto a los restantes medios analizados. Debido a que se priorizará la producción de H_2 y el consumo de glicerol en los ensayos posteriores, el medio de cultivo elegido para la continuidad de este trabajo fue el medio M3.

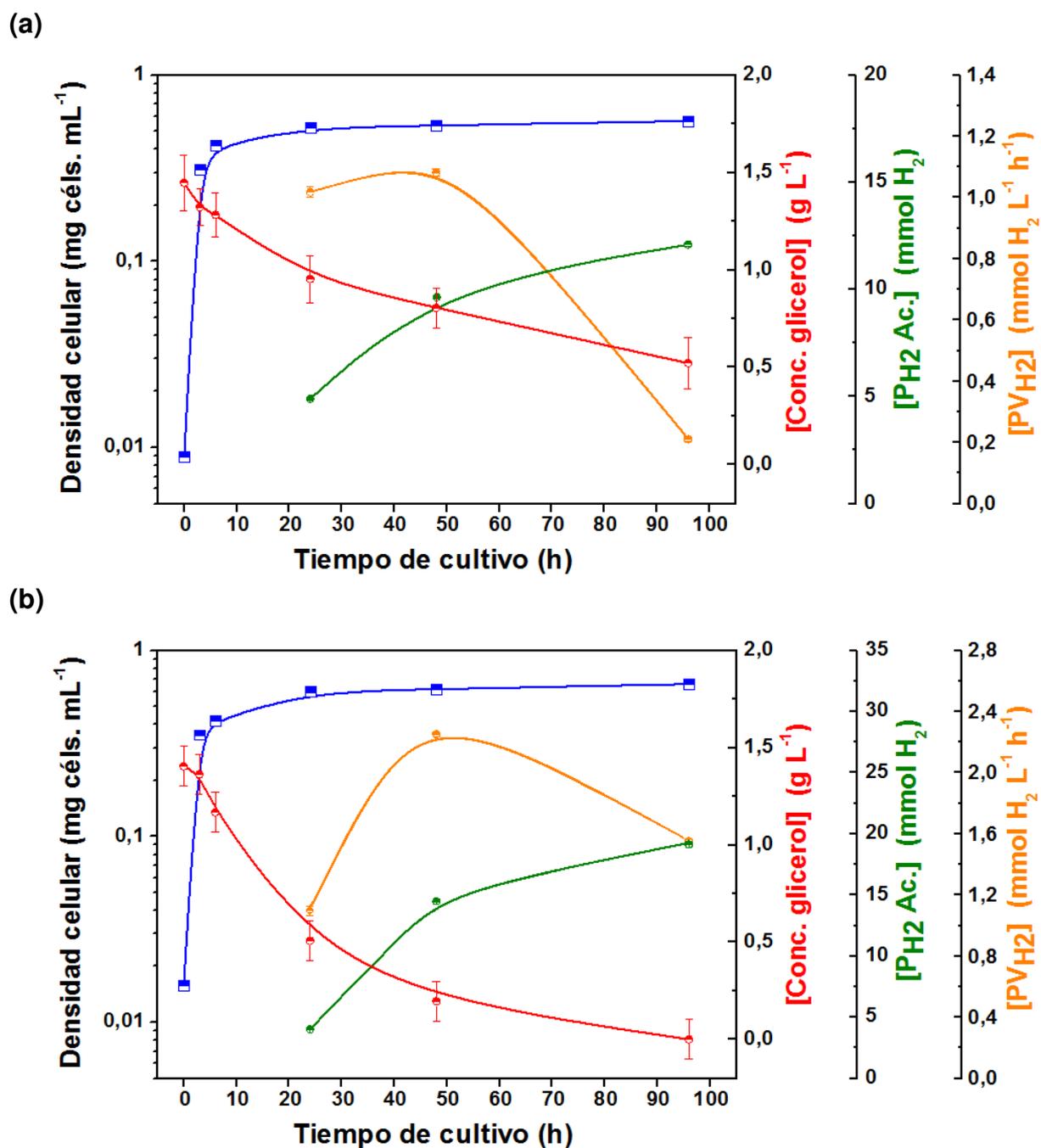


Figura 4.22: Evolución de la densidad celular y de las concentración de glicerol, producción de H_2 y productividad de H_2 , en función del tiempo de cultivo, para las cepas de *E. coli* C_{CON} (a) y C_{HW2} (b) utilizando el medio M3. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada.

4.2.2 Selección del rango de concentraciones de glicerol

Con el objetivo de evaluar la cantidad de glicerol incorporada en la formulación del medio de cultivo M3, se decidió realizar la exploración de un determinado rango de concentraciones para esta fuente de carbono, en donde la producción de H_2 alcanzara un máximo. Para ello, se procedió a cultivar C_{HW2} en 6 medios de cultivo diferentes, conteniendo concentraciones variables de glicerol. La representación de las diferentes concentraciones de glicerol analizadas respecto a los valores de P_{H_2} obtenidos para cada medio de cultivo es mostrada en la **Figura 4.23**.

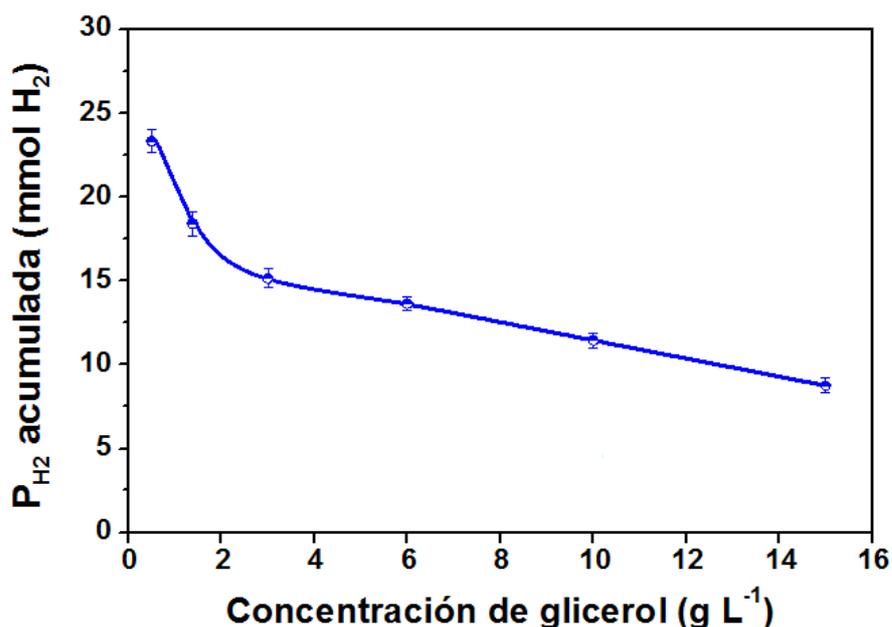


Figura 4.23: Producción acumulada de H_2 (mmol) en función de la concentración de glicerol ($g L^{-1}$) adicionada al medio de cultivo M3. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la muestra calculada.

De la gráfica puede observarse que al incrementar la concentración de glicerol hasta $15,00 g L^{-1}$, la P_{H_2} disminuye hasta alcanzar un valor de $8,75 mmol H_2$. Por otro lado, el aumento de las concentraciones de glicerol de $0,50$ a $3,00 g L^{-1}$ mostró que los valores de P_{H_2} disminuyen de manera más acelerada, mientras que hacia mayores concentraciones de glicerol la pendiente de descenso se vuelve menos pronunciada. De acuerdo con estos resultados, se pudo concluir que la concentración óptima de glicerol en el medio de cultivo M3, con la cual la P_{H_2} alcanzó los máximos valores, se encuentra en el valor $0,50 g L^{-1}$.

4.2.3 Reoptimización de un medio de cultivo

Para maximizar la producción de H_2 y el consumo de glicerol, y al mismo tiempo minimizar la cantidad de biomasa generada en cultivos *batch*, fue requerido encontrar una combinación óptima de las concentraciones de los componentes del medio de cultivo M3 (EL, TT, NaCl y glicerol). Para ello, fue realizado un procedimiento de optimización sistemática empleando la técnica de RSM mediante la construcción de un DCC fraccionado con 2 puntos centrales. La construcción de un DCC fraccionado requiere el agregado de puntos estrella a un diseño de resolución III. Estos puntos estrella son utilizados para evitar la confusión entre los efectos de los factores principales y los obtenidos de sus interacciones. El diseño resultante permite la estimación de interacciones de mayor orden. Adicionalmente, ésta es una manera de reducir el número de experimentos sin perder capacidad de resolución (Hartley, 1959). El diseño elaborado consistió en 30 experimentos obtenidos por la combinación de diferentes rangos de concentraciones de los ingredientes del medio. Las respuestas medidas fueron: concentración de biomasa generada (X) ($mg\ mL^{-1}$), producción de H_2 acumulada (P_{H_2}) (mmoles) y conversión de glicerol (C_G) (adimensional), calculado mediante la diferencia entre la concentración inicial y final de glicerol, dividido por la concentración inicial de glicerol. Los valores obtenidos de las 30 combinaciones sugeridas por el DCC fraccionado y los correspondientes valores para las respuestas son presentados en la **Tabla 4.13**.

Tabla 4.13: DCC fraccionado empleado para la optimización del medio de cultivo M3.Unidades de las respuestas: ^amg cels. mL⁻¹. ^badimensional. ^cmmoles.

Experimento	Factores (g L ⁻¹)				Respuestas		
	EL	TT	NaCl	Glicerol	X ^a	C _G ^b	P _{H2} ^c
1	35,00	40,00	0,50	0,50	0,49	0,99	16,23
2	35,00	20,00	0,50	0,50	0,35	0,94	21,32
3	27,50	30,00	1,50	1,40	0,43	0,93	13,46
4	35,00	40,00	0,50	2,30	0,45	0,93	26,37
5	27,50	20,00	1,00	1,40	0,34	0,93	21,76
6	20,00	20,00	1,50	0,50	0,34	1,00	11,36
7	20,00	20,00	0,50	0,50	0,29	0,98	20,12
8	35,00	20,00	0,50	2,30	0,38	0,92	19,03
9	27,50	30,00	1,00	2,30	0,43	0,92	9,83
10	27,50	30,00	1,00	1,40	0,45	0,96	20,98
11	35,00	20,00	1,50	2,30	0,38	0,88	9,25
12	20,00	20,00	1,50	2,30	0,34	0,91	24,57
13	27,50	30,00	1,00	1,40	0,43	0,95	17,31
14	20,00	20,00	0,50	2,30	0,35	0,96	26,59
15	35,00	30,00	1,00	1,40	0,46	0,94	20,57
16	35,00	40,00	1,50	2,30	0,46	0,93	23,10
17	27,50	30,00	1,00	0,50	0,41	0,96	20,72
18	20,00	30,00	1,00	1,40	0,39	0,98	10,07
19	20,00	40,00	1,50	0,50	0,42	0,99	16,67
20	20,00	40,00	0,50	2,30	0,39	0,96	22,18
21	20,00	40,00	0,50	0,50	0,40	0,95	16,02
22	27,50	30,00	1,00	1,40	0,41	0,97	19,07
23	27,50	30,00	0,50	1,40	0,44	0,96	17,44
24	35,00	20,00	1,50	0,50	0,40	0,98	20,19
25	27,50	30,00	1,00	1,40	0,41	0,94	22,75
26	20,00	40,00	1,50	2,30	0,45	0,97	21,13
27	27,50	30,00	1,00	1,40	0,42	0,98	22,67
28	27,50	40,00	1,00	1,40	0,45	0,97	20,12
29	27,50	30,00	1,00	1,40	0,40	0,96	20,75
30	35,00	40,00	1,50	0,50	0,45	0,96	17,15

Algunos de los resultados estadísticos obtenidos al aplicar un test de ANOVA a los datos obtenidos a partir del diseño realizado son mostrados en la **Tabla 4.14**. Estos resultados permitieron determinar que la respuesta X pudo ser ajustada con un modelo de tipo cuadrático, en donde los factores significativos fueron el EL (término lineal), TT (términos lineal y cuadrático) y NaCl (término cuadrático); la respuesta C_G fue ajustada con un modelo cuadrático, con EL (términos lineal y cuadrático) y glicerol (términos lineal y cuadrático) como factores significativos; y la respuesta P_{H_2} ajustó mejor con un modelo de tipo cúbico, en donde todos los factores resultaron ser significativos para los términos lineal, cuadrático y cúbico.

Tabla 4.14: Resultados estadísticos obtenidos luego de aplicar un test de ANOVA a los datos analizados.

Parámetro estadístico	X^a	C_G^b	$P_{H_2}^c$
Modelo ajustado ^d	C	C	Q
p -Modelo ^e	< 0,0001 (S)	0,0129 (S)	0,0165 (S)
R^2	0,9028	0,7586	0,8346

Unidades de las respuestas: ^amg cels. mL⁻¹; ^badimensional; ^cmmoles.

Tipos de modelo: ^dC: cuadrático, Q: cúbico.

^eS: significativo.

Los modelos obtenidos mediante el test de ANOVA también pueden ser expresados mediante términos matemáticos, según se muestra en las **Ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3**:

$$y_1 = 0,42 + 0,023 x_1 + 0,044 x_2 - 0,031 x_2^2 + 0,011 x_3^2 \quad (4.1)$$

$$y_2 = 0,96 - 0,013 x_1 - 0,020 x_4 + 0,011 x_1^2 - 0,011 x_4^2 \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} y_3 = & 18,50 + 5,25 x_1 - 0,82 x_2 - 1,99 x_3 - 5,45 x_4 + 0,60 x_1 x_2 \\ & + 0,49 x_1 x_3 - 1,09 x_1 x_4 + 0,56 x_2 x_3 + 0,64 x_2 x_4 + 0,14 x_3 x_4 \\ & - 1,10 x_1^2 + 4,52 x_2^2 - 0,97 x_3^2 + 1,14 x_4^2 - 0,74 x_1 x_2 x_3 \\ & + 1,77 x_1 x_2 x_4 - 0,49 x_1 x_3 x_4 - 0,87 x_2 x_3 x_4 + 0,60 x_1^2 x_2 \\ & + 1,09 x_1^2 x_3 + 8,15 x_1^2 x_4 - 5,00 x_1 x_2^2 \quad (4.3) \end{aligned}$$

donde y_1 , y_2 e y_3 representan las respuestas X , C_G y P_{H_2} , respectivamente, y x_1 , x_2 , x_3 y x_4 corresponden a los factores EL, TT, NaCl y glicerol, respectivamente. En estas ecuaciones solo fueron incluidos los factores que resultaron ser significativos para cada una de las respuestas.

Los gráficos de superficie de respuesta correspondientes a las respuestas X , C_G y P_{H_2} son presentados en las **Figuras 4.24**, **4.25** y **4.26**, siendo mostrados en función de las concentraciones evaluadas de EL y TT, y fijando los valores para el NaCl y glicerol en $0,50 \text{ g L}^{-1}$. Para las dos primeras gráficas, se pueden observar las contribuciones cuadráticas de los factores, mientras que en la restante gráfica es posible identificar las contribuciones de tipo cúbicas.

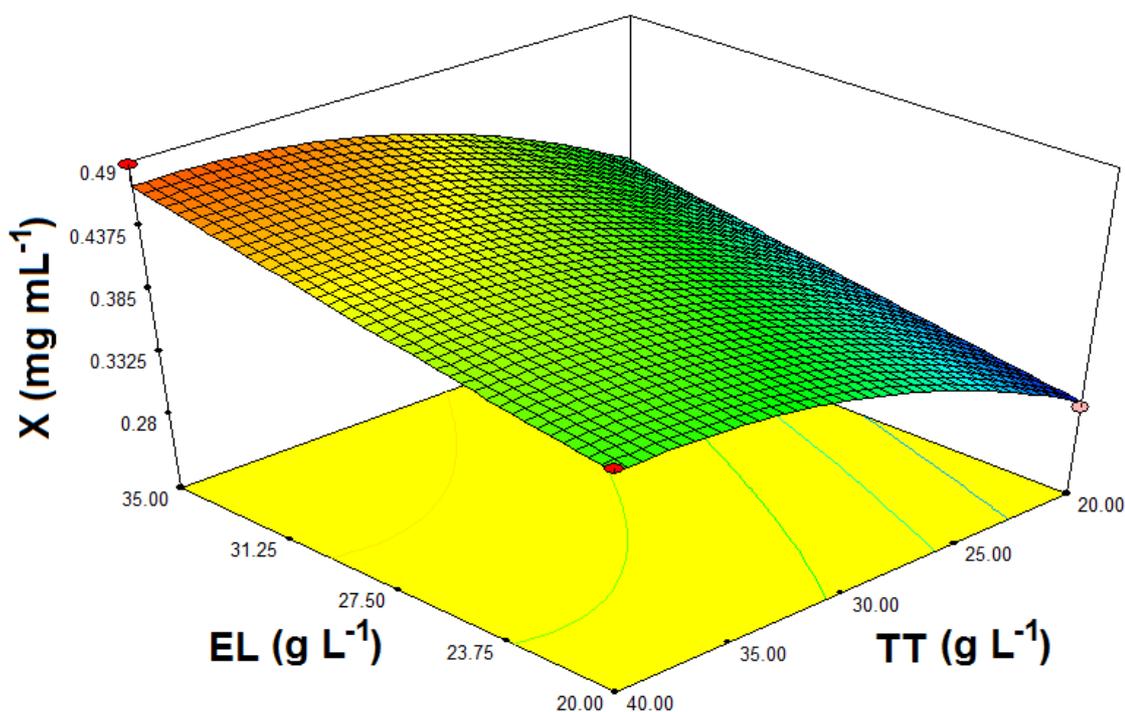


Figura 4.24: Superficie de respuesta correspondientes a la respuesta X como función de EL (g L^{-1}) y TT (g L^{-1}), con NaCl y glicerol en $0,5 \text{ g L}^{-1}$. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas.

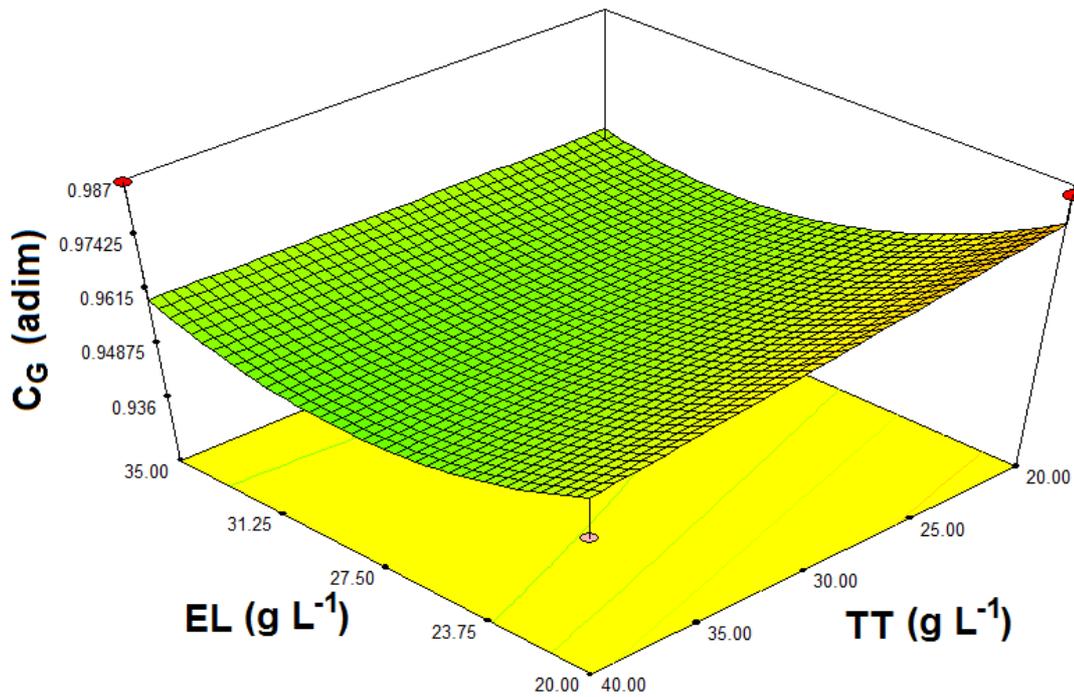


Figura 4.25: Superficie de respuesta correspondientes a la respuesta C_G como función de EL (g L^{-1}) y TT (g L^{-1}), con NaCl y glicerol en $0,5 \text{ g L}^{-1}$. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas.

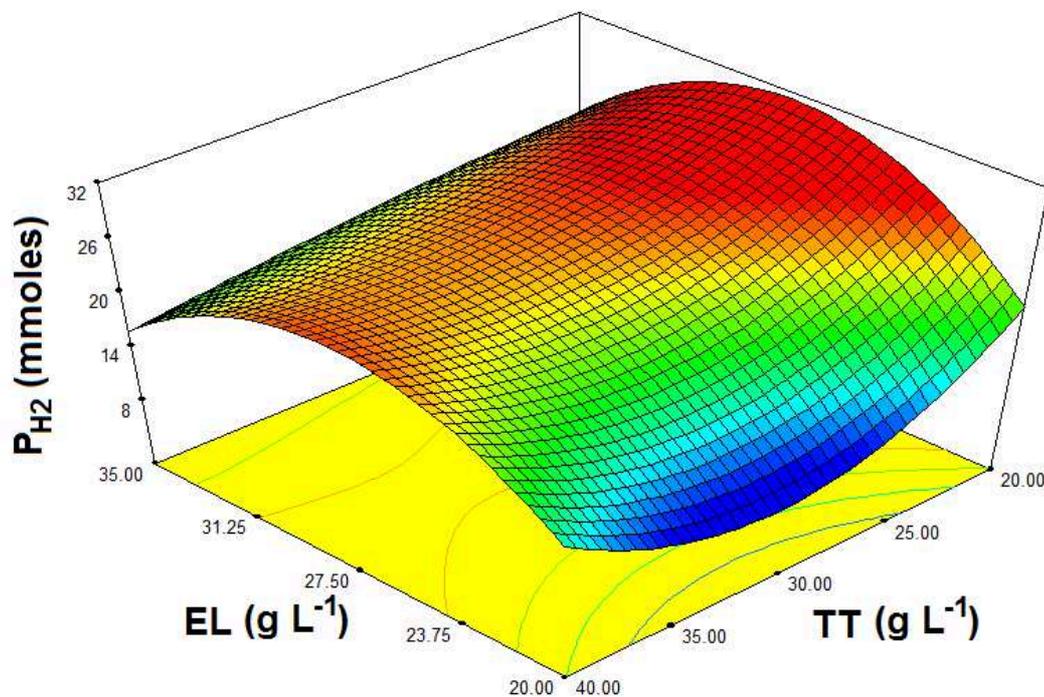


Figura 4.26: Superficie de respuesta correspondientes a la respuesta P_{H_2} como función de EL (g L^{-1}) y TT (g L^{-1}), con NaCl y glicerol en $0,5 \text{ g L}^{-1}$. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas.

La máxima P_{H_2} obtenida luego de realizar el ajuste de los modelos fue de 26,59 mmoles (experimento 14, **Tabla 4.13**), el cual fue 1,5 veces mayor que la concentración obtenida empleando el medio M3 (**Figura 4.23**), donde se obtuvieron 17,59 mmoles de H_2 . Además, el medio posee una cantidad notablemente menor de EL, TT y NaCl respecto de las concentraciones de estos componentes en el M3, y adicionalmente presenta una mayor cantidad de glicerol inicial. Estos hechos justifican en gran medida la utilización y aplicación de la RSM para lograr mejorar las concentraciones de productos de interés y al mismo tiempo realizando la optimización de la formulación del medio de cultivo de trabajo.

Posteriormente se realizó la optimización de la formulación del nuevo medio de cultivo, aplicando la función deseabilidad global (D) (**Ecuación 3.18**) desarrollada por Derringer y Suich (Derringer y Suich, 1980), en donde el mayor valor de dicha función corresponde a los valores óptimos de cada uno de los factores analizados. Los criterios elegidos para realizar la optimización mediante la función deseabilidad global son mostrados en la **Tabla 4.15**:

Tabla 4.15: Criterios seleccionados para realizar el proceso de optimización aplicando la función deseabilidad global.

Factores y respuestas	Criterio de optimización	Límite inferior	Límite superior
EL (g L ⁻¹)	En el rango	20,00	35,00
TT (g L ⁻¹)	En el rango	20,00	40,00
NaCl (g L ⁻¹)	En el rango	0,50	1,50
Glicerol (g L ⁻¹)	En el rango	0,50	2,30
X (mg cels. mL ⁻¹)	Minimizar	0,29	0,49
C _G (adim.)	Maximizar	0,88	1,00
P _{H₂} (mmoles)	Maximizar	9,82	26,59

Luego de la aplicación de la función deseabilidad global, y cumpliendo con los criterios de optimización especificados, se obtuvo una combinación para el nuevo medio de cultivo caracterizada por contener 24,25 g L⁻¹ de EL; 20,00 g L⁻¹ de TT, 0,54 g L⁻¹ de NaCl y 0,50 g L⁻¹ de glicerol, siendo los valores predichos para las respuestas de 0,31 mg cels. mL⁻¹ para X; 0,97 para C_G y 26,59 moles para P_{H₂}. Este nuevo medio de cultivo, con sus componentes optimizados, fue denominado M4). La gráfica de superficie de respuesta obtenida para la función deseabilidad

global en función del EL y TT, fijando el NaCl en $0,54 \text{ g L}^{-1}$ y el glicerol en $0,5 \text{ g L}^{-1}$, es presentada en la **Figura 4.27**. El máximo valor de la función de deseabilidad global, alcanzado con EL en $24,25 \text{ g L}^{-1}$ y TT en $20,00 \text{ g L}^{-1}$ corresponde a $0,887$.

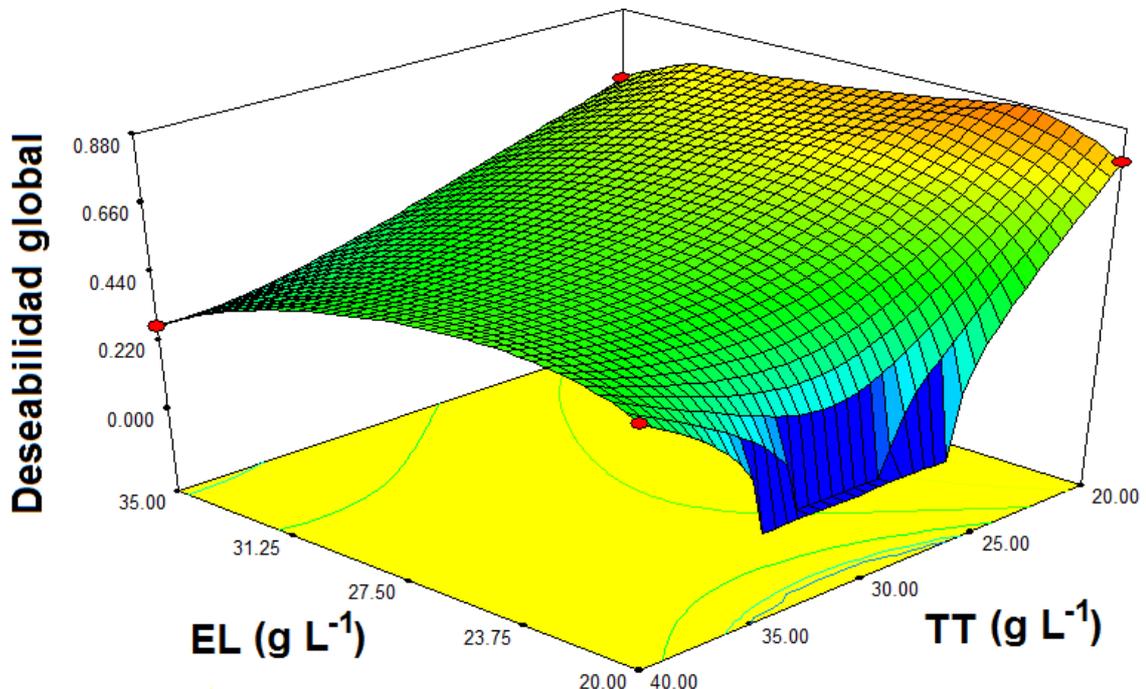


Figura 4.27: Superficie de respuesta correspondientes a la función de deseabilidad global como función de EL (g L^{-1}) y TT (g L^{-1}), fijando NaCl en $0,54 \text{ g L}^{-1}$ y glicerol en $0,50 \text{ g L}^{-1}$. El máximo corresponde a $0,887$, en la región de color naranja. La variación de colores desde el rojo hasta el violeta representa una escala descendente de los valores de las respuestas.

4.2.4 Verificación experimental

Las combinaciones óptimas de componentes obtenidas con la RSM aplicando QLS fueron corroboradas mediante la realización de experimentos independientes adicionales. Durante estos experimentos, se evaluaron los principales parámetros de cultivo a tiempo inicial y final, tales como la concentración de biomasa (X), la concentración de glicerol (para efectuar el cálculo de la C_G) y la P_{H_2} , entre otros valores característicos de un medio de cultivo.

Tanto los valores predichos por el método así como los obtenidos de manera experimental son presentados en la **Tabla 4.16**. Los datos empíricos mostraron un alto grado de similitud con los valores predichos al aplicar la RSM modelando con QLS, lo cual indicó un alto grado de confiabilidad respecto a los ajustes de los modelos realizados empleando estos tipos de técnicas. Por lo tanto, la combinación

de 24,25 g L⁻¹ de EL; 20,00 g L⁻¹ de TT; 0,54 g L⁻¹ NaCl y 0,50 g L⁻¹ de glicerol, permitió generar un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la cepa de *E. coli* C_{HW2}, manteniendo un mínimo crecimiento celular que permitió maximizar no sólo la P_{H2}, sino también el consumo del sustrato glicerol.

Tabla 4.16: Valores de las respuestas obtenidas mediante la aplicación de RSM aplicando QLS y mediante la verificación experimental.

Valor	Respuestas		
	X ^a	C _G ^b	P _{H2} ^c
Predicho	0,31	0,97	26,59
Experimental ^d	0,30	0,99	26,53
Error (±)	0,01	0,01	0,06

Unidades de las respuestas: ^amg cels. mL⁻¹; ^badimensional; ^cmmoles
^dPromedio de un ensayo realizado por triplicado.

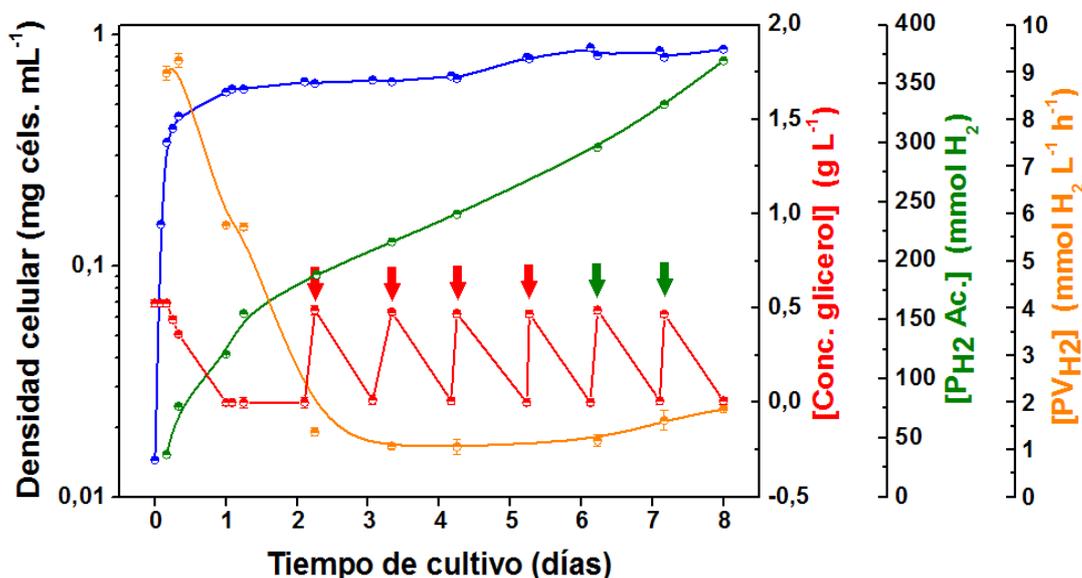
4.2.5 Cultivo en biorreactor tanque agitado

Una vez que los valores predichos para las respuestas estudiadas fueron verificados, se procedió a realizar un cultivo de la cepa C_{HW2} en un biorreactor tanque agitado, operado de manera semi-*batch*.

El medio de cultivo utilizado en este ensayo fue la formulación M4, con un tiempo total de cultivo de 8 días, tomando muestras diarias del cultivo de forma de cuantificar la biomasa generada y evaluar la cantidad de glicerol consumida, junto con la determinación de la P_{H2}. El volumen de medio a utilizar en el biorreactor correspondió a 1 L, y se realizaron alimentaciones sucesivas de una solución concentrada de glicerol (para recuperar la cantidad inicial de este compuesto cuando fue confirmado que el mismo fue consumido completamente) y de TT (para evaluar si existen diferencias al agregar una fuente rica en nutrientes). La evolución de la densidad celular, la concentración de glicerol, la P_{H2} y la PV_{H2}, en función del tiempo de cultivo para la cepa C_{HW2} desarrollado en el biorreactor tanque agitado se presenta en la **Figura 4.28a**. Por otro lado, los parámetros monitoreados de forma *on-line* durante el ensayo, como el pH, pO₂, temperatura y agitación son mostrados en la **Figura 4.28b**. Se observa que las alimentaciones de glicerol fueron indicadas

con las flechas rojas, mientras que el agregado de TT junto con glicerol fue indicado con las flechas verdes.

(a)



(b)

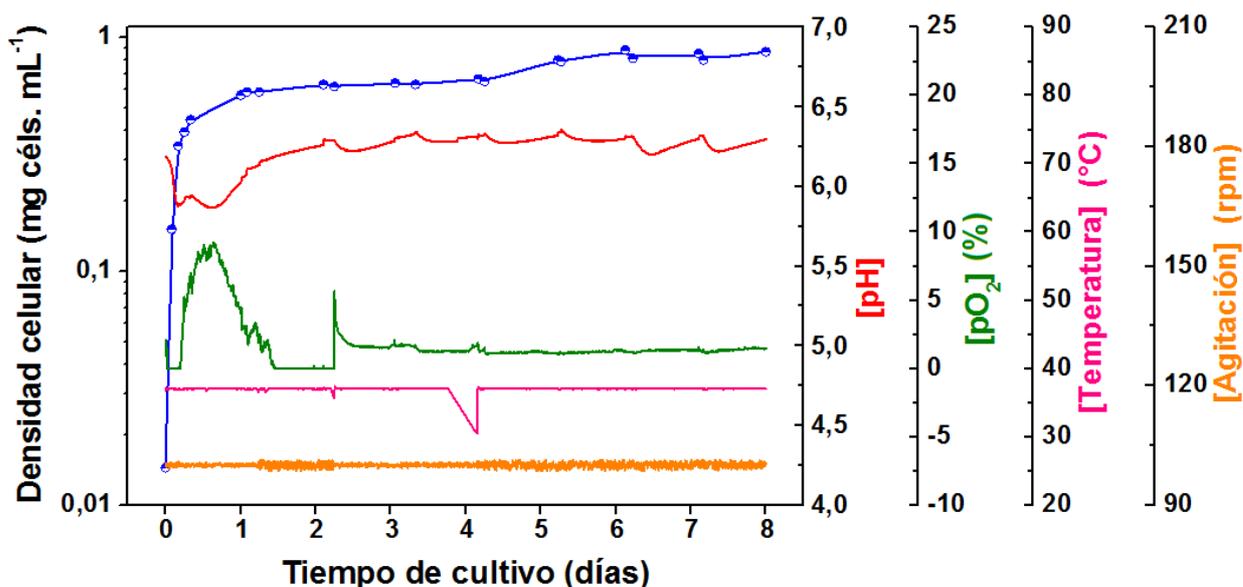


Figura 4.28: Evolución de la densidad celular y de la concentración de glicerol, producción de H₂ acumulada y productividad de H₂ (a), y de la densidad celular junto con los diferentes parámetros monitoreados durante el cultivo (b) en función del tiempo de ensayo, para un cultivo de *E. coli* C_{HW2}, en un biorreactor tipo tanque agitado y empleando el medio optimizado M4. Las flechas rojas indican la alimentación de glicerol estéril y las flechas verdes la incorporación de glicerol y TT estéril.

En relación a la **Figura 4.28a**, se puede observar que la cepa C_{HW2} creció exponencialmente durante las primeras horas del ensayo, alcanzando rápidamente

la fase estacionaria y en la cual fue observado un leve crecimiento celular con el tiempo de cultivo. La fase de crecimiento exponencial se caracterizó por una velocidad específica de crecimiento de $0,51 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, valor idéntico al obtenido con el medio de cultivo sin optimizar desarrollado en un frasco Erlenmeyer con 0,2 L de volumen de trabajo. Este valor difiere notablemente del valor reportado previamente (Hu y Wood, 2010), siendo del doble del valor obtenido ($0,25 \text{ h}^{-1}$) para la misma cepa crecida heterotróficamente en un medio de cultivo con glicerol. La X_{max} alcanzó valores de $0,85 \pm 0,01 \text{ mg células mL}^{-1}$ a los 8 días de cultivo. Al final de la fase de crecimiento exponencial, se alcanzó un valor de densidad celular de $0,55 \text{ mg células mL}^{-1}$, lo cual representó un 16% menos que el valor obtenido en los cultivos desarrollados en frascos Erlenmeyer. Esto indicó que, al menos durante la fase de crecimiento exponencial, se logró una disminución de la densidad celular cuando fue utilizado el mismo medio en un biorreactor tanque agitado. Los rendimientos obtenidos para este ensayo fueron de $0,62 \pm 0,08$, $0,72 \pm 0,07$ y $1,16 \pm 0,11 \text{ g g}^{-1}$, para $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$, $Y_{\text{H}_2/\text{G}}$ y $Y_{\text{X}/\text{G}}$, respectivamente. Estos valores fueron superiores a los obtenidos con el medio de cultivo M3 sin optimizar en los frascos erlenmeyer ($0,46$; $0,21$ y $0,45 \text{ g g}^{-1}$ para $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$, $Y_{\text{H}_2/\text{G}}$ y $Y_{\text{X}/\text{G}}$, respectivamente). Es importante destacar las mejoras encontradas respecto a la mayor producción de H_2 y a la generación de mayor biomasa a tiempo final, dado que los rendimientos obtenidos para el medio de cultivo M4 al finalizar el proceso de optimización y luego de la verificación experimental fueron de $0,53$; $0,41$ y $0,61$ para $Y_{\text{H}_2/\text{X}}$, $Y_{\text{H}_2/\text{G}}$ y $Y_{\text{X}/\text{G}}$, respectivamente.

La P_{H_2} aumentó a partir del inicio del cultivo, lo que indicó que esta cepa es capaz de producir H_2 aún en fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, la productividad de H_2 decae desde valores importantes al inicio del cultivo, hasta un valor de alrededor $1,5 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, manteniéndose prácticamente constante en ese valor desde el día 3 hasta el final del cultivo. El consumo de glicerol fue detectado desde el comienzo del ensayo, y fue consumido completamente luego del primer día de ensayo. Luego del segundo día de cultivo, se comenzó a incorporar una solución concentrada de glicerol estéril diariamente al biorreactor, variando la concentración inicial de la misma de modo que al inyectarse al sistema se obtenga un valor de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol, para luego evaluar la evolución del cultivo. Con cada inyección de glicerol, se produjo una mínima reducción en la densidad celular propia del efecto de dilución del medio de cultivo, así como pequeñas variaciones en el pH del medio, pero prácticamente sin modificaciones en

las concentraciones de oxígeno disuelto. Si bien existen pequeñas disminuciones iniciales en la densidad celular luego de incorporar la solución de glicerol, el agregado de la misma permitió un leve incremento de la concentración celular en las horas posteriores a la alimentación. A pesar de que la concentración de la fuente de carbono aumentó en el medio de cultivo, las células de *E. coli* se mantuvieron en fase estacionaria y la densidad celular registró sólo un leve incremento entre los días 4 y 8. La concentración de glicerol incorporada de manera diaria es consumida en menos de un día de cultivo. Respecto de la producción de H_2 , la misma aumenta desde el inicio de los cultivos hasta el día 1, pero luego comienza a descender lentamente con el tiempo de cultivo aún cuando el glicerol fue alimentado diariamente al sistema y consumido en el mismo lapso de tiempo. Al inicio de los días 6 y 7 fue incorporado al sistema la solución de glicerol y junto con ella se adicionó una solución concentrada de TT, que al inyectarse al sistema alcanza una concentración final de 10 g L^{-1} . Posteriormente a la inyección, se determinó un leve incremento en la producción de H_2 , lo cual puede observarse en la **Fig. 4.28a** como un incremento en la pendiente de la curva de P_{H_2} a partir del día 6 de cultivo, así como un leve incremento en la productividad a H_2 . Esto parece indicar que si bien el glicerol es incorporado o consumido por las células, es probable que no todo el glicerol sea utilizado completamente para la síntesis de H_2 , pudiendo ser empleado como fuente de carbono para cubrir otras vías metabólicas, o bien estas células requieren esencialmente de ciertos componentes presentes en la TT para mantener una adecuada actividad hacia la producción de H_2 .

Capítulo 5



Conclusiones

Con referencia a los objetivos propuestos para este trabajo de tesis, las conclusiones finales son:

► Se prepararon catalizadores monometálicos de níquel soportados sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, adicionando 4 y 12% p/p de cobalto, o bien 2, 4 y 6% p/p de cerio, mediante impregnación por humedad incipiente. Todos los materiales mostraron mesoporos, con ausencia de macroporos. Se observó un correcto anclaje de las partículas metálicas al soporte $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, junto con la presencia de partículas metálicas de mayor tamaño en los materiales con cobalto. Fueron identificadas estructuras típicas de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ junto con NiAl_2O_4 , detectando débilmente la especie NiO , posiblemente debido a la baja carga de Ni utilizada. Las especies Ni impregnadas en Al_2O_3 fueron difíciles de reducir, mostrando adecuada dispersión y una fuerte interacción metal-soporte. En los materiales con cobalto, fue evidente la presencia de especies de óxido de cobalto libre (Co_3O_4), espinela de níquel y cobalto (NiCo_2O_4) y CoAl_2O_4 superpuesta con NiAl_2O_4 . Para los materiales con cerio, se observó la aparición de especies tipo fluorita (CeO_2), con una deposición metálica relativamente homogénea sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. El soporte presentó OH ácidos, neutros y básicos, y las especies metálicas de níquel, cobalto y cerio disminuyeron el grado de hidratación superficial al aumentar la carga.

► El comportamiento catalítico de los materiales durante el reformado en fase gas del glicerol generó H_2 como producto principal, seguido por CO_2 , CO y CH_4 en menor proporción. La presencia de cobalto desfavoreció la producción de H_2 y favoreció la de CO_2 al aumentar la temperatura, mientras que la formación de CH_4 mejora al aumentar la carga de metal. La menor carga de Co produjo la mayor cantidad de H_2 y la menor de CO_2 a menor temperatura, con bajos niveles de CO y CH_4 . La mayor carga de Co mejoró la producción de H_2 a menor temperatura, pero esto no ocurrió al aumentar la temperatura de reacción. La presencia de cerio favoreció la generación de H_2 para todos los catalizadores a menor temperatura, con mejores valores a baja carga. La cantidad de H_2 disminuyó y la de CH_4 fue levemente superior a mayor temperatura de reacción, con incremento en la fracción CO . Los principales compuestos líquidos identificados en la reacción fueron MHA, acetona, metanal, etanal y 2-hidroxietanal.

- ▶ El aumento de la carga de Co favoreció la conversión a productos gaseosos a menores temperaturas. La menor carga de Co generó relaciones GS promisorias a menores temperaturas, y la mayor carga de Co presentó valores de GS adecuados a mayor temperatura. El aumento de la carga de Ce mejoró la conversión a productos gaseosos. La menor carga de Ce a menor temperatura generó la mejor cantidad de H₂, mientras que a mayor temperatura la carga intermedia produjo valores de GS adecuados y la carga mayor logró valores promisorios de GS.

- ▶ La identificación de los depósitos de carbón en los catalizadores luego de la reacción permitió inferir sobre la naturaleza de los mismos, los cuales corresponden principalmente a carbón grafitico y amorfo. El depósito carbonoso formado durante la reacción presentó características olefínicas al operar a menor temperatura y aromática al trabajar a mayor temperatura, para ambos tipos de catalizadores. Los precursores del depósito carbonoso podrían ser más fácilmente removidos de la superficie a mayor temperatura. El aumento de la carga de Co generó menor cantidad de carbón a las menores temperaturas, mientras que la disminución de la carga generó menor cantidad de carbón a mayor temperatura. El aumento de la carga de Ce provocó una disminución en las cantidades de carbón, posiblemente por la adecuada capacidad del CeO₂ de distribuir O₂ a través de la red estructural del material, demostrando una mayor eficiencia en la oxidación de los depósitos formados en el catalizador.

- ▶ La utilización de un glicerol proveniente de biorrefinería y sin tratamiento previo fue factible para ser empleado para su transformación a H₂. Se generó más CO y menos CO₂ con GP que con GC, asociado a la presencia de impurezas en el GC provenientes del proceso de obtención de biodiesel.

- ▶ Durante la desactivación, la disminución del H₂ ocurrió por menor disponibilidad de sitios activos en el catalizador por formación de carbón, y por reacciones que generan CH₄ a expensas del H₂ formado. La primera regeneración fue bastante efectiva, pero a medida que aumentan los ciclos de operación, las regeneraciones lograron recuperar cada vez menos la actividad catalítica, generando mayor cantidad de CO y CH₄, con una leve disminución de CO₂ y una disminución mayor para H₂. La conversión a productos gaseosos disminuyó a mayor número de ciclos, y la formación de productos líquidos se hizo cada vez mayor al incrementar los

ciclos. Parte de los depósitos de carbón no fueron completamente eliminados del catalizador, por encontrarse fuertemente adsorbidos en el soporte, afectando la actividad de los sitios metálicos. La naturaleza del carbón fue principalmente gráfica, con menor generación de carbón amorfo.

► La cepa identificada como promisorio para la producción de H_2 a partir de glicerol, C_{HW2} , presentó mayor consumo de glicerol y producción acumulada de H_2 que la cepa C_{CON} , así como un crecimiento celular superior en todos los ensayos. Esto confirmó que la C_{HW2} presenta un camino metabólico más eficiente hacia la utilización del glicerol, junto con una notable mejora hacia la producción de H_2 por represión de determinadas vías metabólicas que disminuyen su rendimiento.

► La formulación y utilización de medios de cultivo existentes tiene una incidencia sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos durante los ensayos. Se observó una mejora de estos parámetros cuando los medios presentan fuentes de nutrientes más complejas, respecto de cultivos más simples. En los diferentes medios desarrollados, no sólo se definieron las variables operativas, sino que se priorizó la presencia de glicerol en sus formulaciones, de manera de aprovechar un desecho industrial que posee un bajo valor económico. Con ello, se contribuyó a resolver potenciales problemas medioambientales, planteando una alternativa a la disposición final de este desecho.

► La optimización de un medio de cultivo, junto con el agregado de glicerol, demostró que el crecimiento celular con la cepa C_{HW2} puede ser mejorado, permitiendo la generación de un producto de interés energético, tal como lo es el H_2 , y favoreciendo el consumo del glicerol por parte de este microorganismo. Esto pudo concretarse gracias al empleo de diferentes herramientas quimiométricas avanzadas, que facilitaron el estudio de este proceso biotecnológico y permitieron predecir las combinaciones óptimas de factores. Los objetivos buscados pudieron ser alcanzados gracias a la aplicación de RSM a través de QLS, seguido de la optimización de múltiples respuestas mediante la aplicación de la función deseabilidad global. En este caso, QLS rindió resultados confiables, lo que sugirió que los modelos ajustados poseen una alta complejidad.

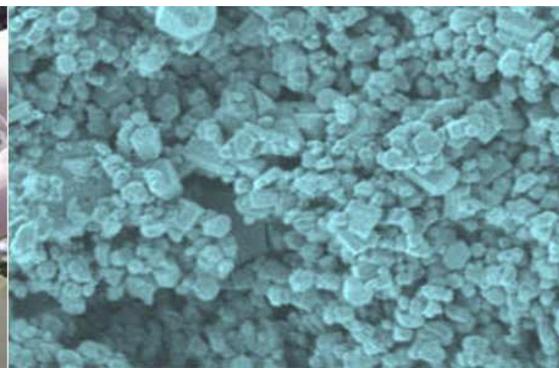
► La utilización del medio de cultivo optimizado con la cepa C_{HW2} en un biorreactor semi-*batch*, demostró que la densidad celular durante la fase de crecimiento

exponencial fue 16% menor que la encontrada en cultivos en frascos Erlenmeyer, mientras que la producción acumulada de H₂ fue 9 veces superior al comparar el biorreactor respecto del frasco Erlenmeyer a igual tiempo de cultivo. Respecto a la productividad de H₂, la misma se mantuvo constante luego del día 3, indicando que esta cepa fue capaz de producir H₂ aún en fase estacionaria de crecimiento.

► Fue posible incluir al glicerol en la formulación de un medio de cultivo, y aunque el mismo fue incorporado o consumido por las células, es probable que no haya sido utilizado por completo para la síntesis de H₂. Las células podrían emplear al glicerol como fuente de carbono para cubrir otras vías metabólicas, o bien las mismas requieren esencialmente de ciertos componentes presentes en la TT para mantener una adecuada actividad hacia la producción de H₂.

► Mediante este trabajo de tesis, fue posible determinar que el glicerol, una materia prima económica y disponible, pudo ser transformado mediante procesos catalíticos y sistemas biológicos, generando compuestos de alto valor agregado y/o energético para la industria actual, como lo es el H₂. Debido a que los procesos catalíticos generan un consumo intensivo de energía y requieren de catalizadores activos y selectivos hacia los productos de interés, esta tesis logró mejorar las características de ciertos catalizadores, y al mismo tiempo identificar los mejores consumos de glicerol y producciones de H₂. Para el caso de los sistemas biológicos, la producción de H₂ ofrece ventajas relacionados al empleo de una tecnología más sencilla, limpia y con menores gastos energéticos, aunque con menores rendimientos a los productos de interés. Respecto a ello, este trabajo mejoró las características de un medio de cultivo disponible mediante su optimización, logrando maximizar el consumo de glicerol y la producción de H₂, siempre con una mínima producción de biomasa. Finalmente, el uso de una materia prima renovable contribuyó al mejoramiento del medio ambiente, debido a que permitió valorizar la creciente industria de producción del biodiesel e incrementar el valor económico de los subproductos generados.

Capítulo 6



Bibliografía

- Abd El-Hafiz, D.R.; Ebiad, M.A. y El-salamony, R.A. (2014) *Hydrogen selectivity and carbon behavior during gasoline steam reforming over nano-Al₂O₃ catalysts*. Mater. Renew. Sustain. Energy 3: 34.
- Adhikari, S.; Fernando, S. y Haryanto, A. (2007a) *A comparative thermodynamic and experimental analysis on hydrogen production by steam reforming of glycerin*. Energy Fuels 21: 2306-2310.
- Adhikari, S.; Fernando, S.; Gwaltney, S.R.; Filip To, S.D.; Bricka, R.M.; Steele, P.H. y Haryanto, A. (2007b) *A thermodynamic analysis of hydrogen production by steam reforming of glycerol*. Int. J. Hydrogen Energy 32: 2875-2880.
- Adhikari, S.; Fernando, S. y Haryanto, A. (2007c) *Production of hydrogen by steam reforming of glycerin over alumina-supported metal catalysts*. Catal. Today 129: 355-364.
- Adhikari, S.; Fernando, S.D.; Filip To, S.D.; Bricka, R.M.; Steele, P.H. y Haryanto, A. (2008a) *Conversion of glycerol to hydrogen via a steam reforming process over nickel catalysts*. Energy Fuels 22: 1220-1226.
- Adhikari, S.; Fernando, S.D. y Haryanto, A. (2008b) *Hydrogen production from glycerin by steam reforming over nickel catalysts*. Renew. Energy 33: 1097-1100.
- Adhikari, S.; Fernando, S.D. y Haryanto, A. (2009) *Hydrogen production from glycerol: An update*. Energy Conversion and Management 50: 2600-2604.
- Aguirre Guevara, O.A. (2013) *Celdas de Hidrógeno y su Potencial de Aplicación*, Tesis de Ingeniería, Universidad Veracruzana, Facultad de Ingeniería Mecánica Eléctrica, Xalapa, México, p. 18-72.
- Alberton, A.L.; Souza, M. y Schmal, M. (2007) *Carbon formation and its influence on ethanol steam reforming over Ni/Al₂O₃ catalysts*. Catal. Today 123: 257-264.
- Almeida Bezerra, M.; Erthal Santelli, R.; Padua Oliveira, E.; Silveira Villar, L. y Amélia Escaleira, L. (2008) *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. Talanta 76: 965-977.
- Alvarez-Galvan, M.C.; Navarro R.M.; Rosa F.; Briceño M.; Ridao M.A. y Fierro J.L.G. (2008) *Hydrogen production for fuel cell by oxidative reforming of diesel surrogate: influence of ceria and/or lanthana over the activity of Pt/Al₂O₃ catalysts*. Fuel 87: 2502-2511.
- Álvarez Maciel C. (2009) *Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional*. Economía informa 359: 63-89.

- Andy, P.; Gnep, N.S.; Guisnet, M.; Benazzi, E. y Travers, C. (1998) *Skeletal Isomerization of n-Butenes: II. Composition, Mode of Formation, and Influence of Coke Deposits on the Reaction Mechanism*. J. Catal. 173: 322-332.
- Arabiourrutia, M.; López, G.; Aguado, R. y Olazar, M. (2010) *Efecto del uso de Catalizadores Ácidos sobre la Distribución de Productos en la Pirólisis de Neumáticos*. Información Tecnológica 21: 33-41.
- Araque, M.; Martínez, T.L.M.; Vargas, J.C. y Roger, A.C. (2011) *Hydrogen production by glycerol steam reforming over CeZrCo fluorite type oxides*. Catal. Today 176: 352-356.
- Araque, M.; Martínez, L.M.; Vargas, J.C.; Centeno, M.A. y Roger, A.C. (2012) *Effect of the active metals on the selective H₂ production in glycerol steam reforming*. Appl. Catal. B-Environ. 125: 556-566.
- Araujo, P.W. y Brereton, R.G. (1996) *Experimental Design II. Optimization*. Trends Anal. Chem. 15: 63-70.
- Asadullah, M.; Ito, S.I.; Kunimori, K.; Yamada, M. y Tomishige, K. (2002) *Energy efficient production of hydrogen and syngas from biomass: development of low-temperature catalytic process for cellulose gasification*. Environ. Sci. Technol. 36: 4476-4481.
- Auroux A.; Monaci R.; Rombi E.; Solinas V.; Sorrento A. y Santacesaria E. (2001) *Acid sites investigation of simple and mixed oxides by TPD and microcalorimetric techniques*. Thermochim. Acta 379: 227-231.
- Authayanun, S.; Arpornwichanop, A.; Paengjuntuek, W. y Assabumrungrat S. (2010) *Thermodynamic study of hydrogen production from crude glycerol autothermal reforming for fuel cell applications*. Int. J. Hydrogen Energy 35: 6617-6623.
- Ayoub, M. y Abdullah, A.Z. (2012) *Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry*. Renew. Sust. Energ. Rev. 16: 2671-2686.
- Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K.A.; Tomita, M.; Wanner, B.L. y Mori, H. (2006) *Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection*. Mol. Syst. Biol. 2: 1-11.
- Baker, R.T. y Metcalfe, I.S. (1995) *Study of the activity and deactivation of Ni-YSZ cermet in dry CH₄ using temperature-programmed techniques*. Ind. Eng. Chem. Res. 34: 1558-1565.

- Barbirato, F. y Bories, A. (1997) Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Res. Microbiol.* 148: 475-484.
- Bartholomew, C.H. (1982) *Carbon deposition in steam reforming and methanation.* *Catal. Reviews* 24: 67-112.
- Bartholomew, C.H. (2001) *Mechanisms of catalyst deactivation.* *Appl. Catal. A-Gen.* 212: 17-60.
- Batista, M.S.; Santos, R.K.S.; Assaf, E.M.; Assaf, J.M. y Ticianelli, E.A. (2004) *High efficiency steam reforming of ethanol by cobalt-based catalysts.* *J. Power Sources* 134: 27-32.
- Bedoya, A.; Castrillón, J.C.; Ramírez, J.E.; Vásquez, J.E. y Zabala M.A. (2008) *Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte.* *Dyna* 154: 137-157.
- Bertani, G. (2004) *Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2 and other experimental systems.* *J. Bacteriol.* 186: 595-600.
- Blesa, M.; Romero-Pascual, E. y Monzón, A. (2002) *Reformado de CH₄ con CO₂ sobre catalizadores de Ni-Zn-Al con estructura espinela.* *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 1: 1-12.
- Bobadilla, L.F.; Álvarez, A.; Domínguez, M.I.; Romero-Sarria, F.; Centeno, M.A.; Montes, M. y Odriozola, J.A. (2012) *Influence of the shape of Ni catalysts in the glycerol steam reforming.* *Appl. Catal. B-Environ.* 123-124: 379-390.
- Borowieki, T. (1987) *Nickel catalysts for steam reforming of hydrocarbons: direct and indirect factors affecting the coking rate.* *Appl. Catal.* 31: 207-220.
- Botas, J.A.; Calles, J.A.; Dufour, J. y San Miguel G. (2005) *La Economía del Hidrógeno. Una Visión Global sobre la Revolución Energética del Siglo XXI - 1. Producción y Almacenamiento de Hidrógeno.* *Acta Cient. Technol.* 9: 33-36.
- Brentner, L.B.; Peccia J. y Zimmerman, J.B. (2010) *Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: Implications for a research agenda.* *Environ. Sci. Technol.* 44: 2243-2254.
- British Petroleum. (2014) *BP Statistical Review of World Energy.* BP Publications, London, U.K. p. 6-34.
- Buffoni, I.N.; Pompeo, F.; Santori, G.F. y Nichio, N.N. (2009) *Nickel catalysts applied in steam reforming of glycerol for hydrogen production.* *Catal. Commun.* 10: 1656-1660.

- Byrd, A.J.; Pant, K.K. y Gupta, R.B. (2008) *Hydrogen production from glycerol by reforming in supercritical water over Ru/Al₂O₃ catalyst*. Fuel 87: 2956-2960.
- Cai, J. y Wang, G. (2012) *Hydrogen production by a marine photosynthetic bacterium, Rhodovulum sulfidophilum P5, isolated from a shrimp pond*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 15070-15080.
- Cámara de Diputados y Senadores. (2006a) *Ley 26.093: Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentables de Biocombustibles*. Buenos Aires, Argentina.
- Cámara de Diputados y Senadores. (2006b) *Ley 26.123: Régimen para el Desarrollo de la Tecnología, Producción, Uso y Aplicaciones del Hidrógeno como Combustible y Vector de Energía*. Buenos Aires, Argentina.
- Cardona, C.A. y Sánchez, Ó.J. (2007) *Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities*. Bioresour. Technol. 98: 2415-2457.
- Carrillo, L. (2003) *Microbiología agrícola*. 1 Edición, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina, p 160.
- Cayol, J.L.; Ollivier, B.; Lawson, A.; Soh, A.L.S.; Fardeau, M.L.; Ageron, E.; Grimont, P.A.D.; Prensier, G.; Guezennec, J.; Magot, M. y Garcia, J.L. (1994) *Haloicola saccharolytica subsp. senegalensis subsp. nov., Isolated from the sediments of a hypersaline lake, and emended description of Haloicola saccharolytica*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 805-811.
- Cayol, J.L.; Ollivier, B.; Patel, B.K.C.; Ageron, E.; Grimont, P.A.D.; Prensier, G. y Garcia, J.L. (1995) *Haloanaerobium lacusroseus sp. nov., an extremely halophilic fermentative bacterium from the sediments of a hypersaline lake*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 790-797.
- Chang, A.C.C.; Lin, W.H.; Lin, K.H.; Hsiao, C.H.; Chen, H.H. y Chang, H.F. (2012) *Reforming of glycerol for producing hydrogen in a Pd/Ag membrane reactor*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 13110-13117.
- Chai, S.H.; Wang, H.P.; Liang, Y. y Xu, B.Q. (2007) *Sustainable production of acrolein: investigation of solid acid-base catalysts for gas-phase dehydration of glycerol*. Green Chem. 9: 1130-1136.
- Charwath, M. (2013) *¿Glicerina Natural Quo Vadis?* Glaconews 4: 1-12.
- Chaudhary, N.; Ngadi, M.O.; Simpson, B.K. y Kassama, L.S. (2011) *Biosynthesis of ethanol and hydrogen by glycerol fermentation using Escherichia Coli*. Adv. Chem. Eng. Sci. 1: 83-89.

- Chen, H.; Ding, Y.; Cong, N.T.; Dou, B.; Dupont, V.; Ghadiri, M. y Williams, P.T. (2011) *A comparative study on hydrogen production from steam-glycerol reforming: thermodynamics and experimental*. *Renew. Energy* 36: 779-788.
- Chen W.H. (2006) *Biological hydrogen production by anaerobic fermentation*. Tesis de Doctorado, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A., p. 8-25.
- Chen, X.; Zhou, L.; Tian, K.; Kumar, A.; Singh, S.; Prior, B.A. y Wang, Z. (2013) *Metabolic engineering of Escherichia coli: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production*. *Biotechnol. Adv.* 31: 1200-1223.
- Cheng, C.K.; Foo, S.Y. y Adesina, A.A. (2010a) *H₂-rich synthesis gas production over Co/Al₂O₃ catalyst via glycerol steam reforming*. *Catal. Commun.* 12: 292-298.
- Cheng, C.K.; Foo, S.Y. y Adesina, A.A. (2010b) *Glycerol steam reforming over bimetallic Co-Ni/Al₂O₃*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49: 10804-10817.
- Cheng, C.K.; Foo, S.Y. y Adesina, A.A. (2011) *Carbon deposition on bimetallic Co-Ni/Al₂O₃ catalyst during steam reforming of glycerol*. *Catal. Today* 164: 268-274.
- Chiodo, V.; Freni, S.; Galvagno, A.; Mondello, N. y Frusteri F. (2010) *Catalytic features of Rh and Ni supported catalysts in the steam reforming of glycerol to produce hydrogen*. *Appl. Catal. A-Gen.* 381: 1-7.
- Chookaew, T.; O-Thong, S. y Prasertsan, P. (2012) *Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant Klebsiella pneumoniae TR17*. *Int. J. Hydrogen Energy* 37: 13314-13322.
- Chum, H.; Faaij, A. y Moreira J. (2011) *Bioenergy*. En: *Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation - Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Eds: Edenhofer, O.; Pichs-Madruga, R.; Sokona, Y.; Seyboth, K.; Matschoss, P.; Kadner, S.; Zwickel, T.; Eickemeier, P.; Hansen, G.; Schlömer, S. y von Stechow C.) Cambridge University Press, New York, U.S.A., p. 209-332.
- Cofre, O.; Ramírez, M.; Gómez, J. y Cantero, D. (2012) *Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by Escherichia coli*. *Biomass Bioenerg.* 37: 275-281.
- Cortright, R.D. (2005) *Hydrogen generation from biomass-derived compounds utilizing aqueous-phase reforming*. IEEE Vehicle Power and Propulsion Conference, Chicago, U.S.A., p. 1-3.
- Clomburg, J.M. y Gonzalez, R. (2011) *Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of 1,2-propanediol from glycerol*. *Biotechnol. Bioeng.* 108: 867-879.

- Cui, Y.; Galvita, V.; Rihko-Struckmann, L.; Lorenz, H. y Sundmacher, K. (2009) *Steam reforming of glycerol: The experimental activity of $La_{1-x}Ce_xNiO_3$ catalyst in comparison to the thermodynamic reaction equilibrium*. *App. Catal. B-Environ.* 90: 29-37.
- Cullity, B.D. y Stock, S.R. (2001) *Elements of X-ray diffraction*. 3 Edición, Prentice-Hall Inc., New Jersey, U.S.A., p 167-171.
- Czernik, S.; French, R.; Feik, C. y Chornet, E. (2002) *Hydrogen by catalytic steam reforming of liquid byproducts from biomass thermoconversion processes*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41: 4209-4215.
- Damyanova, S.; Perez, C.A.; Schmal, M. y Bueno, J.M.C. (2002) *Characterization of ceria-coated alumina carrier*. *Appl. Catal. A-Gen.* 234: 271-282.
- Das, D. y Veziroglu, T.N. (2001) *Hydrogen production by biological processes: a survey of literature*. *Int. J. Hydrogen Energy* 26: 13-28.
- Dauenhauer, P.J.; Salge, J.R. y Schmidt, L.D. (2006). *Renewable hydrogen by autothermal steam reforming of volatile carbohydrates*. *J. Catal.* 244: 238-247.
- De Aguiar, P.F.; Bourguignon, B.; Khots, M.S.; Massart, D.L. y Phan-Thau-Luu, R. (1995) *D-Optimal designs*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30: 199-210.
- De Lima S.M., Silva A.M., da Cruz I.O., Jacobs G., Davis B.H. and Mattos L.V. (2008) *H₂ production through steam reforming of ethanol over Pt/ZrO₂, Pt/CeO₂ and Pt/CeZrO₂ catalysts*. *Catal. Today* 138: 162-168.
- De Lima, S.M.; Silva, A.M.; Graham, U.M.; Jacobs, G.; Davis, B.H.; Mattos, L.V. y Noronha, F.B. (2009) *Ethanol decomposition and steam reforming of ethanol over CeZrO₂ and Pt/CeZrO₂ catalyst: Reaction mechanism and deactivation*. *Appl. Catal. A-Gen.* 352: 95-113.
- Demirbas, A. y Arin, G. (2004) *Hydrogen from biomass via pyrolysis: relationships between yield of hydrogen and temperature*. *Energy Sources* 26: 1061-1069.
- Demirbas, A. (2005) *Recovery of chemicals and gasoline-range fuels from plastic wastes via pyrolysis*. *Energy Sources* 27: 1313-1319.
- Derringer, G. y Suich, R. (1980) *Simultaneous optimization of several response variables*. *J. Qual. Technol.* 12: 214-219.
- Desai, K.M.; Survase, S.A.; Saudagar, P.S.; Lele, S.S. y Singhal, R.S. (2008) *Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan*. *Biochem. Eng. J.* 41: 266—273.

- Dharmadi, Y.; Murarka, A. y Gonzalez, R. (2006) *Anaerobic fermentation of glycerol by Escherichia coli: A new platform for metabolic engineering*. Biotechnol. Bioeng. 94: 821-829.
- Diagne, C., Idriss, H., Pearson, K., Gómez-García, M.A. y Kiennemann, A. (2004) *Efficient hydrogen production by ethanol reforming over Rh catalysts. Effect of addition of Zr on CeO₂ for the oxidation of CO to CO₂*. Comptes Rendus Chimie 7: 617-622.
- Didier, C.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Goicoechea, H.C. (2007) *Crossed mixture design and multiple response analysis for developing complex culture media used in recombinant protein production*. Chemomet. Intell. Lab. Syst. 86: 1-9.
- Dieuzeide, M.; Iannibelli, V.; Jobbagy, M. y Amadeo, N. (2012) *Steam reforming of glycerol over Ni/Mg/γ-Al₂O₃ catalysts. Effect of calcination temperatures*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 14926-14930.
- Dimanta, I.; Nikolajeva, V.; Gruduls, A.; Muiznieks, I. y Kleperis, J. (2013) *Assessment of bio-hydrogen production from glycerol and glucose by fermentative bacteria*. Energetika 59: 124-128.
- Doran, P.M. (1998) *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Editorial Acribia, 1 Edición, Zaragoza, España, p 484.
- Dou, B.; Dupont, V.; Rickett, G.; Blakeman, N.; Williams, P.T.; Chen, H.; Ding, Y. y Ghadiri, M. (2009) *Hydrogen production by sorption-enhanced steam reforming of glycerol*. Bioresour. Technol 100: 3540-3547.
- Douette, A.M.D.; Turn, S.Q.; Wang, W. y Keffer, V.I. (2007) *Experimental investigation of hydrogen production from glycerin reforming*. Energy Fuels 21: 3499-3504.
- Dubini, A.; Pye, R.L.; Jack, R.L.; Palmer, T. y Sargent, F. (2002) *How bacteria get energy from hydrogen: a genetic analysis of periplasmic hydrogen oxidation in Escherichia coli*. Int. J. Hydrogen Energy 27: 1413-1420.
- Durnin, G.; Clomburg, J.; Yeates, Z.; Alvarez, P.J.J.; Zygorakis, K.; Campbell, P. y Gonzalez, R. (2009) *Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 103: 148-161.
- Dutta, D.; De, D.; Chaudhuri, S. y Bhattacharya, S. (2005) *Hydrogen production by Cyanobacteria*. Microbial Cell Factories 4:36.
- El Doukkali, M.; Iriando, A.; Arias, P.L.; Requies, J.; Gandarías, I.; Jalowiecki-Duhamel, L. y Dumeignil, F. (2012) *A comparison of sol-gel and impregnated Pt*

- or/and Ni based γ -alumina catalysts for bioglycerol aqueous phase reforming.* Appl. Catal. B-Environ. 125: 516-529.
- Elías Castells, X. y Jurado de Gracia, L. (2005) *El Hidrógeno y las Pilas de Combustible.* En: *Tratamiento y Valorización Energética de Residuos* (Ed: Elías Castells, X.) Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, p. 1033-1120.
- European Parliament and Council of European Union (2009). *Directive 2009/28/EC: Promotion of the Use of Energy from Renewable Sources and Amending and Subsequently Repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC.* Brussels, Belgium.
- Fábrega Ramos, M. (2009) *Hidrógeno, aplicación en motores de combustión interna.* Proyecto Final de Ingeniería, Universidad Politécnica de Cataluña, Facultad de Náutica, Barcelona, España, p. 66-86.
- Fan, X.; Burton, R. y Zhou, Y. (2010) *Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals - Mini Review.* Open Fuels Energy Sci. 3: 17-22.
- Farrauto, R.; Hwang, S.; Shore L.; Ruettinger, W.; Lampert, J.; Giroux, T.; Liu, Y. y Ilinich, O. (2003) *New material needs for hydrocarbon fuel processing: generating hydrogen for the PEM fuel cell.* Ann. Rev. Mater. Res. 33: 1-27.
- Fernández, S.; De Los Santos, C. y Castiglioni, J. (2012) *Gasificación catalítica de cáscara de arroz: dos reactores vs. un reactor.* XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay, p. 1-11.
- Ferrer-Miralles, N.; Domingo-Espín, J.; Corchero, J.L.; Vázquez, E. y Villaverde, A. (2009) *Microbial factories for recombinant pharmaceuticals.* Microbial Cell Factories 8:17.
- Fonseca, A. y Assaf, E.M. (2005) *Production of the hydrogen by methane steam reforming over nickel catalysts prepared from hydrotalcite precursors.* J. Power Sources 142: 154-159.
- Foo, S.Y.; Cheng, C.K.; Nguyen, T.H.; Kennedy, E.M.; Dlugogorski, B.Z. y Adesina, A.A. (2012) *Carbon deposition and gasification kinetics of used lanthanide-promoted Co-Ni/Al₂O₃ catalysts from CH₄ dry reforming.* Catal. Commun. 26: 183-188.
- Fouchard, S.; Pruvost, J.; Degrenne, B. y Legrand, J. (2008) *Investigation of H₂ production using the green microalga Chlamydomonas reinhardtii in a fully controlled photobioreactor fitted with on-line gas analysis.* Int. J. Hydrogen Energy 33: 3302-3310.

- Freedonia Group. (2014) *World Hydrogen Demand 2013 (246 billion cubic meters)*. World Hydrogen, p 1-331.
- Funk, J.E. (2001) Thermochemical hydrogen production: past and present. *Int. J. Hydrogen Energy* 26: 185-190.
- Furusawa, T. y Tsutsumi, A. (2005) *Comparison of Co/MgO and Ni/MgO catalysts for the steam reforming of naphthalene as a model compound of tar derived from biomass gasification*. *Appl. Catal. A-Gen* 278: 207-212.
- García, J.; Santana, Z.; Zumalacárregui, L.; Quintana, M.; González, D.; Furrázola, G. y Cruz, O. (2013) *Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli*. *Vacci Monitor* 22: 30-39.
- García, R.A.; Serrano, D.P. y Otero, D. (2005) *Catalytic cracking of HDPE over hybrid zeolitic-mesoporous materials*. *J. Anl. Appl. Pyrol.* 74: 379-386.
- Ghazali, F.M.; Rahman, R.N.Z.A.; Salleh, A.B. y Basri, M. (2004) *Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 54: 61-67.
- Gholami, Z.; Abdullah A.Z. y Lee K.T. (2014) *Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products*. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 39: 327-341.
- Giordano, P.; Martínez, H.; Iglesias, A.; Beccaria, A. y Goicoechea, H. (2010) *Application of response surface methodology and artificial neural networks for optimization of recombinant Oryza sativa non-symbiotic hemoglobin 1 production by Escherichia coli in medium containing byproduct glicerol*. *Bioresour. Technol.* 101: 7537-7544.
- Giordano, P.C.; Beccaria, A.J.; Goicoechea, H.C. y Olivieri, A.C. (2013) *Optimization of the hydrolysis of lignocellulosic residues by using radial basis functions modeling and particle swarm optimization*. *Biochem. Eng. J.* 80: 1-9.
- Giordano, P.C.; Beccaria, A.J. y Goicoechea, H.C. (2014) *Rational design of a culture medium for the intensification of lipid storage in Chlorella sp. Performance evaluation in air-lift bioreactor*. *Biores. Technol.* 158: 269-277.
- Giraldo, S.; Franco, A. y Ríos L. (2008) *Síntesis de Cetales de Glicerina y su Uso como Aditivos para Biodiesel*. *Revista Tecnológica ESPOL* 21: 71-77.
- Gonzalez, R.; Murarka, A.; Dharmadi, Y. y Yazdani, S.S. (2008) *A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 10: 234-245.

- Guo, Y.; Wang, S.Z.; Xu, D.H.; Gong, Y.M.; Ma, H.H. y Tang X.Y. (2010) *Review of catalytic supercritical water gasification for hydrogen production from biomass*. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 334-343.
- Gupta, B.S.; Hashim, M.A.; Ramachandran, K.B.; Gupta, I.S. y Cui, Z.F. (2005) *The effect of gas sparging in cross-flow microfiltration of 2,3-butanediol fermentation broth*. *Eng. Life Sci.* 5: 54-57.
- Hallenbeck, P.C. y Benemann, J.R., (2002) *Biological hydrogen production, Fundamentals and limiting processes*. *Int. J. Hydrogen Energy* 27: 1185-1193.
- Hamelinck, C.N.; y Faaij, A.P.C. (2002) *Future prospects for production of methanol and hydrogen from biomass*. *J Power Sources* 111: 1-22.
- Hao, D.C.; Zhu, P.H.; Yang, S.L. y Yang, L. (2006) *Optimization of recombinant Cytochrome P450 2C9 protein production in Escherichia coli DH5a by statistically-based experimental design*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 1169-1176.
- Hardiman, K.M.; Ying, T.T.; Adesina, A.A.; Kennedy, E.M. y Dlugogorski, B.Z. (2004) *Performance of a Co-Ni catalyst for propane reforming under low steam-to-carbon ratios*. *Chem. Eng. J.* 102: 119-130.
- Hardiman, K.M. (2007) *Propane reforming under carbon induced deactivation: catalyst design and reactor operation*. Tesis de Doctorado, University of New South Wales, School of Chemical Sciences and Engineering, Sydney, Australia, p 367.
- Hartley, H.O. (1959) *Smallest Composite Designs for Quadratic Response Surfaces*. *Biometrics.* 15: 611-624.
- Hirai, T.; Ikenaga, N.; Miyake, T. y Suzuki, T. (2005) *Production of hydrogen by steam reforming of glycerin on ruthenium catalyst*. *Energy Fuels* 19: 1761-1762.
- Hilbert, J. (2013) *Biomasa*. En: *+ Renovables 2012/2013* (Ed: Cámara Argentina de Energías Renovables). Buenos Aires, Argentina, p. 38-47.
- Holladay, J.D.; Hu, J.; King, D.L. y Wang, Y. (2009) *An overview of hydrogen production technologies*. *Catal. Today* 139: 244-260.
- Höök, M.; Hirsch, R. y Aleklett, K. (2009) *Giant oil field decline rates and their influence on world oil production*. *Energy Policy* 37: 2262-2272.
- Hu, H. y Wood, T.K. (2010) *An evolved Escherichia Coli strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1033-1038.
- Hu, X. y Lu, G. (2010) *Acetic acid steam reforming to hydrogen over Co-Ce/Al₂O₃ and Co-La/Al₂O₃ catalysts. The promotion effect of Ce and La addition*. *Catal. Commun.* 12: 50-53.

- Huang, L.; Zhu, Y.L.; Zheng, H.Y.; Li, Y.W. y Zeng, Z.Y. (2008) *Continuous production of 1,2-propanediol by the selective hydrogenolysis of solvent-free glycerol under mild conditions*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 83: 1670-1675.
- Huber, G.W. y Dumesic, J.A. (2006) *An overview of aqueous-phase catalytic processes for production of hydrogen and alkanes in a biorefinery*. Catal. Today 111: 119-132.
- Infiniti Research Group. (2014) *Global Syngas Market 2014-2018*. London, U.K., p 1-64.
- International Energy Agency. (2008) *World Energy Outlook*. IEA Publications, Paris, France, p. 77-136.
- International Energy Agency. (2011) *Technology Roadmaps: Biofuels for Transport*. IEA Publications, Paris, France, p. 5-20.
- International Energy Agency. (2013) *World Energy Outlook*. IEA Publications, Paris, France, p. 1-12.
- International Energy Agency. (2014) *Key World Energy Statistics*. IEA Publications, Paris, France, p. 1-80.
- Iriundo, A.; Barrio, V.L.; Cambra, J.F.; Arias, P.L.; Güemez, M.B.; Navarro, R.M.; Sánchez-Sánchez, M.C. y Fierro, J.L.G. (2008) *Hydrogen production from glycerol over nickel catalysts supported on Al₂O₃ modified by Mg, Zr, Ce or La*. Top. Catal. 49: 46-58.
- Iriundo, A.; Barrio, V.L.; Cambra, J.F.; Arias, P.L.; Güemez, M.B.; Navarro, R.M.; Sánchez-Sánchez, M.C. y Fierro, J.L.G. (2009) *Influence of La₂O₃ modified support and Ni and Pt active phases on glycerol steam reforming to produce hydrogen*. Catal. Commun. 10: 1275-1278.
- Iriundo, A.; Barrio, V.L.; Cambra, J.F.; Arias, P.L.; Güemez, M.B.; Sánchez-Sánchez, M.C.; Navarro, R.M. y Fierro, J.L.G. (2010) *Glycerol Steam Reforming over Ni Catalysts Supported on Ceria and Ceria-Promoted Alumina*. Int. J. Hydrogen Energy 35: 11622-11633.
- Iriundo, A.; Barrio, V.L.; El Doukkali, M.; Cambra, J.F.; Güemez, M.B.; Requies, J.; P.L. Arias, P.L.; Sánchez-Sánchez, M.C.; Navarro, R.M. y Fierro, J.L.G. (2012) *Biohydrogen production by gas phase reforming of glycerine and ethanol mixtures*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 2028-2036.
- Ito, T.; Nakashimada, Y.; Senba, K.; Matsui, T. y Nishio, N. (2005) *Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process*. J Biosci Bioeng. 100: 260-265.

- Izquierdo, J.F.; Galán, M.; Jutglar, L. y Villarrubia, M. (2012) *Revalorización de la glicerina para producir aditivos de combustibles mediante eterificación con olefinas C5*. Anales de Química 108: 40-43.
- Jacobs, G., Chaney, J.A., Patterson, P.M., Das, T.K. y Davis, B.H. (2004) *Fischer-Tropsch synthesis: study of the promotion of Re on the reduction property of Co/Al₂O₃ catalysts by in situ EXAFS/XANES of Co K and Re LIII edges and XPS*. Appl. Catal. A 264: 203-212.
- Jacobs, G. y Davis, B.H. (2007) *Low temperature water-gas shift: applications of a modified SSITKA-DRIFTS method under conditions of H₂ co-feeding over metal/ceria and related oxides*. Appl. Catal. A 333: 192-201.
- Jitrwung, R. y Yargeau, V. (2011) *Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol*. Int. J. Hydrogen Energy 36: 9602-9611.
- Jitrwung, R.; Verrett, J. y Yargeau, V. (2013) *Optimization of selected salts concentration for improved biohydrogen production from biodiesel-based glycerol using Enterobacter aerogenes*. Renew. Energy 50: 222-226.
- Joensen, F. y Rostrup-Nielsen, J.R. (2002) *Conversion of hydrocarbons and alcohols for fuel cells*. J. Power Sources 105: 195-201.
- Jongsomjit, B.; Panpranot, J. y Goodwin Jr., J.G. (2001) *Co-support compound formation in alumina-supported cobalt catalysts*. J. Catal. 204: 98-109.
- Kalamaras, C.M. y Efstathiou, A.M. (2013) *Hydrogen Production Technologies: Current State and Future Developments*. Conference Papers in Energy 2013: 1-9.
- Kamonsuangkasem, K.; Therdthianwong, S. y Therdthianwong, A. (2013) *Hydrogen production from yellow glycerol via catalytic oxidative steam reforming*. Fuel Process. Technol. 106: 695-703.
- Kansiz, M.; Gapes, J.R.; Mac Naughton, D.; Lendl, B. y Schuster, K.C. (2001) *Mid-infrared spectroscopy coupled to sequential injection analysis for the on-line monitoring of the acetone-butanol fermentation process*. Anal. Chim. Acta 438, 175-186.
- Kapdan, I. y Kargi, F. (2006) *Biohydrogen production from waste materials*. Enzyme Microb. Technol. 38: 569-582.
- Kapteijn, F.; van Langeveld, A.; Moulijn, J.; Andreini, A.; Vuurman, M.; Turek, A.; Jehng, J. y Wachs I. (1994) *Alumina-Supported Manganese Oxide Catalysts: I. Characterization: Effect of Precursor and Loading*. J. Catal. 150: 94-104.

- Kapteijn, F.; Singoredjo, L.; van Driel, M.; Andreini, A.; Moulijn, J.; Ramis, G. y Busca, G. (1994) *Alumina-Supported Manganese Oxide Catalysts: II. Surface Characterization and Adsorption of Ammonia and Nitric Oxide*. J. Catal. 150: 105-116.
- Khanna, S.; Goyal, A. y Moholkar, V.S. (2011) *Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using Clostridium pasteurianum immobilized on Amberlite*. Fuel 112: 557-561.
- Kim, E.J.; Lee, M.K.; Kim, M.S. y Lee, J.K. (2008) *Molecular hydrogen production by nitrogenase of Rhodospirillum rubrum and by Fe-only hydrogenase of Rhodospirillum rubrum*. Int. J. Hydrogen Energy 33: 1516-1521.
- King, D.L.; Zhang, L.; Xia, G.; Karim, A.M.; Heldebrant, D.J.; Wang, X.; Peterson, T. y Wang Y. (2010) *Aqueous phase reforming of glycerol for hydrogen production over Pt-Re supported on carbon*. Appl. Catal. B-Environ. 99: 206-213.
- King, D. (2011) *The Future of Industrial Biorefineries*. World Economic Forum (WEF). Geneva, Switzerland, p 8-40.
- Kivistö, A.; Santala, V. y Karp, M. (2010) *Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria*. Biores. Technol. 101: 8671-8677.
- Knözinger, H. y Ratnasamy, P. (1978) *Catalytic Aluminas: Surface Models and Characterization of Surface Sites*. Catal. Rev. Sci. Eng. 17: 31-70.
- Konieczny, A.; Mondal, K.; Wiltowski, T. y Dydo, P. (2008) *Catalyst development for thermocatalytic decomposition of methane to hydrogen*, Int. J. Hydrogen Energy 33 264-272.
- Kovács, K.; Maróti, G. y Rákhely. G. (2006) *A novel approach for biohydrogen production*. Int. J. Hydrogen Energy 31: 1460-1468.
- Krummenacher, J.J.; West, K.N. y Schmidt, L.D. (2003) *Catalytic partial oxidation of higher hydrocarbons at millisecond contact times: decane, hexadecane, and diesel fuel*. J. Catal. 215 332-343.
- Kruse, A. (2009) *Hydrothermal biomass gasification*. J. Supercrit. Fluids 47: 391-399.
- Laurinavichene, T.V.; Fedorova, A.S.; Ghirardi, M.L.; Seibert, M. y Tsygankov A.A. (2006) *Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii cells*. Int. J. Hydrogen Energy 31: 659-667.
- Leardi, R. (2009). *Experimental design in chemistry: A tutorial*. Anal. Chim. Acta 652: 161-172.

- Lee, K.S.; Lin, P.J. y Chang, J.S. (2006) *Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers*. Int. J. Hydrogen Energy 31: 465-472.
- Lehnert, K. y Claus, P. (2008) *Influence of Pt particle size and support type on the aqueous-phase reforming of glycerol*. Catal. Commun. 9: 2543-2546.
- Len, C. y Luque, R. (2014) *Continuous flow transformations of glycerol to valuable products: an overview*. Sustain. Chem. Process. 2: 1-10.
- Levin, D.; Pitt L. y Love, M. (2004) *Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application*. Int. J. Hydrogen Energy 29: 173-185.
- Li, C. y Stair, P.C. (1997) *Ultraviolet Raman spectroscopy characterization of coke formation in zeolites*. Catal. Today 33: 353-360.
- Li, H.; Zhu, Y.; Mao, Z.; Gu, J.; Zhang, J.; y Qian, Y. (2008) *Synthesis and characterization of carbon fibrils formed by stacking graphite sheets of nanometer thickness*. Carbon 47: 313-347.
- Li, J.; Liu, J.; Liao, S. y Yan, R. (2010a) *Hydrogen-rich gas production by air-steam gasification of rice husk using supported nano-NiO/ γ -Al₂O₃ catalyst*. Int. J. Hydrogen Energy 35: 7399-7404.
- Li, Y.; Wang, W.; Chen, B. y Cao, Y. (2010b) *Hydrogen production by sorption-enhanced steam reforming of glycerol*. Int. J. Hydrogen Energy 35: 7768-7777.
- Licht, F.O. (2012a) *Fuel Ethanol*. World Ethanol and Biofuels Report 10: 320-323.
- Licht, F.O. (2012b) *The 2012 World Biodiesel Balance*. World Ethanol and Biofuels Report 10: 277-281.
- Liguras, D.K.; Kondarides, D.I. y Verykios, X.E. (2003) *Production of hydrogen for fuel cells by steam reforming of ethanol over supported noble metal catalysts*. Appl. Catal. B-Environ. 43: 345-354.
- Liley, P.E.; Thomson, G.H.; Friend D.G.; Daubert, T.E. y Buck E. (1997) *Physical and chemical data*. En: *Perry's chemical engineers' handbook*. McGraw-Hill, New York, U.S.A., p 2.1-2.374.
- Lin, C.Y. y Chang, R.C. (2004) *Fermentative hydrogen production at ambient temperature*. Int. J. Hydrogen Energy 29: 715-720.
- Lin, C.Y. y Chen, H.P. (2006) *Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora*. Int. J. Hydrogen Energy 31: 953-960.
- Lin, K.H.; Lin, W.H.; Hsiao, C.H.; Chang, H.F. y Chang, A.C.C. (2012) *Hydrogen production in steam reforming of glycerol by conventional and membrane reactors*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 13770-13776.

- Lo, Y.C.; Chen, X.J.; Huang, C.Y.; Yuan, Y.J. y Chang, J.S. (2013) *Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria*. Int. J. Hydrogen Energy 38: 15815-15822.
- Lo Jacono, M.; Schiavello, M. y Cimino, A. (1971) *Structural, magnetic, and optical properties of nickel oxide supported on η - and γ -aluminas*. J. Phys. Chem. 75: 1044-1050.
- López-Munguía, A. (2000) *La biotecnología*. Colección Tercer Milenio. Conaculta, México, p. 31-38.
- Losen, M.; Frolich, B.; Pohl, M. y Büchs, J. (2004) *Effect of oxygen limitation and medium composition on Escherichia coli fermentation in shake-flask cultures*. Biotechnol. Prog. 20: 1062-1068.
- Luo, N.; Ouyang, K.; Cao, F. y Xiao, T. (2010) *Hydrogen generation from liquid reforming of glycerin over Ni-Co bimetallic catalyst*. Biomass Bioenerg. 34: 489-495.
- Maeda, T., Sanchez-Torres, V. y Wood, T.K. (2008) *Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production*. Microb. Biotechnol. 1: 30-39.
- Maervoet, V.E.T.; Beauprez, J.; de Maeseneire, S.L.; Soetaert, W.K. y de Mey, M. (2012) *Citrobacter werkmanii, a new candidate for the production of 1,3-propanediol: Strain selection and carbon source optimization*. Green Chem. 14: 2168-2178.
- Manfro, R.L.; da Costa, A.F.; Ribeiro, N.F.P. y Souza, M.M.V.M. (2011) *Hydrogen production by aqueous-phase reforming of glycerol over nickel catalysts supported on CeO₂*. Fuel Process. Technol. 92: 330-335.
- Manfro, R.L.; Ribeiro, N.F.P. y Souza, M.M.V.M. (2013) *Production of hydrogen from steam reforming of glycerol using nickel catalysts supported on Al₂O₃, CeO₂ and ZrO₂*. Catal. Sustain. Energy 1: 60-70.
- Mangayil, R.; Karp, M. y Santala, V. (2012) *Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 12198-12204.
- Markocic, E.; Kramberger, B.; van Bennekom, J.G.; Heeres, H.J.; Vos J. y Knez, Z. (2013) *Glycerol reforming in supercritical water; a short review*. Renew. Sust. Energy Rev. 23: 40-48.
- Markov, S.A.; Averitt, J. y Waldron, B. (2011) *Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium Enterobacter aerogenes*. Int. J. Hydrogen Energy 36: 262-266.
- Maru, B.T.; Constanti, M.; Stchigel, A.M.; Medina, F. y Sueiras, J.E. (2013) *Biohydrogen production by dark fermentation of glycerol using Enterobacter and Citrobacter sp.* Biotechnol. Prog. 29: 31-38.

- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J. y Smeyers-Verbeke, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*. Elsevier Science, Amsterdam, Holanda, p. 155-726.
- Mattos A.; Probst S.; Afonso J. y Schmal M. (2004) *Hydrogenation of 2-Ethylhexen-2-al on Ni/Al₂O₃ catalysts*. J. Braz. Chem. Soc. 15: 760-766.
- Mazumdar, S.; Clomburg, J.M. y Gonzalez, R. (2010) *Escherichia coli strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol*. Appl. Environ. Microbiol. 76: 4327-4336.
- McKinney, M.L. y Schoch, R.M. (2012) *Air Pollution: Local and Regional*. En: *Environmental Science: Systems and Solutions* (Eds: McKinney, M.L.; Schoch, R.M. y Yonavjak L.) Jones & Bartlett Learning, Burlington, U.S.A., p. 471-500.
- Melis, A. y Happe T. (2001) *Hydrogen production: Green algae as source of energy*. Plant Physiol. 127: 740-748.
- Melon Peñalver, A. (2008) *Análisis de la situación actual y el potencial del hidrógeno como vector energético en el futuro*. Proyecto Final de Ingeniería, Universidad Pontificia Comillas, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Madrid, España, p 17-72.
- Menezes, A.O.; Rodrigues, M.T.; Zimmaro, A.; Borges, L.E.P. y Fraga, M.A. (2011) *Production of renewable hydrogen from aqueous-phase reforming of glycerol over Pt catalysts supported on different oxides*. Renew. Energy 36: 595-599.
- Menzel, K.; Zeng, A.P. y Deckwer W.D. (1997) *High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by Klebsiella pneumoniae*. Enzyme Microb. Technol. 20; 82-86.
- Metsoviti, M.; Zeng, A.P.; Koutinas, A.A. y Papanikolaou, S. (2013) *Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated Citrobacter freundii strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses*. J. Biotechnol. 163: 408-418.
- Mielke, T. (2014) *Oil World Statistics 2014*. Oil World. Hamburg, Germany p. 1-678.
- Miessler, G.L.; Fischer, P.J. y Tarr, D.A. (2014). *Chemistry of the Main Group Elements*. En: *Inorganic Chemistry* (Eds: Miessler, G.L.; Fischer, P.J. y Tarr, D.A.) Pearson Education, Upper Saddle River, U.S.A., p. 249-312.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A., p 466.
- Miller, J.N. y Miller, J.C. (1993) *Estadística y quimiometría para química analítica*. (Eds.: Capella, I. y Caicoya, M) Prentice-Hall, Madrid, España, p. 43-217.

- Misturini Rossi, D.; Berne da Costa, J.; Aquino de Souza, E.; Do Carmo Ruaro Peralba, M.; Samios, D. y Zachia Ayub M.A. (2011) *Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel*. Int. J. Hydrogen Energy 36: 4814-4849.
- Mohd Yusoff, M.Z.; Maeda, T.; Sanchez-Torres, V.; Ogawa, H.I.; Shirai, Y.; Hassan, M.A. y Wood, T.K. (2012) *Uncharacterized Escherichia Coli proteins YdjA and YhjY are related to biohydrogen production*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 17778-17787.
- Montgomery, D.C. (1991) *Diseño y análisis de experimentos*. (Eds: Grepe, N.) Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., México, p. 45-505.
- Moreira, G.A.; Micheloud, G.A.; Beccaria, A.J. y Goicoechea, H.C. (2007) *Optimization of the Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-1 d-endotoxins production by using experimental mixture design and artificial neural networks*. Biochem. Eng. J. 35: 48-55.
- Muradov, N.Z. y Veziroglu, T.N. (2005) *From hydrocarbon to hydrogen-carbon to hydrogen economy*. Int. J. Hydrogen Energy 30: 225-237.
- Murarka, A.; Dharmadi, Y.; Yazdani, S.S. y Gonzalez, R. (2008) *Fermentative utilization of glycerol by Escherichia coli and its implications for the production of fuels and chemicals*. Appl. Environm. Microbiol. 74: 1124-1135.
- Myers, R.H. y Montgomery, D.C. (1995) *Response Surface Methodology*. (Eds. Barnett, V. y Bradley, R.A.) John Wiley & Sons, New York, U.S.A., p. 208-264.
- Nakano, K.; Rischke, M; Sato, S. y Märkl, H. (1997) *Influence of acetic acid on the growth of Escherichia coli K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 597-601.
- Nakashimada, Y.; Rachman, M.A.; Kakizono, T. y Nishio, N. (2002) *Hydrogen production of Enterobacter aerogenes altered by extracellular and intracellular redox states*. Int. J. Hydrogen Energy 27: 1399-1405.
- Nashawi, I.S.; Malallah, A. y Al-Bisharah, M. (2010) *Forecasting World Crude Oil Production Using Multicyclic Hubbert Model*. Energy Fuels 24: 1788-1800.
- Nath, K. y Das, D. (2004) *Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 520-529.
- Ni, M.; Leung, D.Y.C. y Leung, M.K.H. (2007) *A review on reforming bio-ethanol for hydrogen production*. Int. J. Hydrogen Energy 32: 3238-3247.

- Nikerel, E.; Oner, E.; Kirdar, B. y Yildirim, R. (2006) *Optimization of medium composition for biomass production of recombinant Escherichia coli cells using response surface methodology*. Biochem. Eng. J. 32: 1-6.
- Nimlos, M.R.; Blanksby, S.J.; Qian, X.; Himmel, M.E. y Johnson D.K. (2006) *Mechanisms of glycerol dehydration*. J. Phys. Chem. 110: 6145-6156.
- Noronha, F.B.; Fendley, E.C.; Soares, R.R.; Alvarez W.E. y Resasco, D.E. (2001) *Correlation between catalytic activity and support reducibility in the CO₂ reforming of methane over Pt/Ce_xZr_{1-x}O₂ catalysts*. Chem. Eng. J. 82: 21-31.
- Ocsachoque, M.A. (2012) *Desarrollo de Catalizadores Metálicos Soportados para la Obtención de Gas de Síntesis*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, p. 7-24.
- Ogden, J.M.; Steinbugler, M.M. y Kreutz, T.G. (1999) *Comparison of hydrogen, methanol and gasoline as fuels for fuel cell vehicles: implications for vehicle design and infrastructure development*. J. Power Sources 79: 143-168.
- Okano, K.; Tanaka, T.; Ogino, C.; Fukuda, H. y Kondo, A. (2010) *Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 413-423.
- Owen, N.A.; Inderwildi, O.R. y King, D.A. (2010) *The status of conventional world oil reserves - Hype or cause for concern?* Energy Policy 38: 4743-4749.
- Padilla, J.M.; del Angel, G.; Bertin, V.; Cortes-López, A.J.; Fierro, J.L.G. y Poisot, M. (2013) *Combustión de tolueno en catalizadores de Pd y Pt soportados en Al₂O₃ y Al₂O₃-Ce*. Revista Mexicana de Ingeniería Química 12: 73-83.
- Padilla Flores, J.M. (2009) *Efecto de la adición de Ce³⁺ o La³⁺ a la Boehmita en catalizadores de Pd/γ-Al₂O₃-Ce y Pt/γ-Al₂O₃-La en la combustión de benceno y tolueno*. Tesis doctoral en Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., México, p 119.
- Pairojpiriyakul, T.; Croiset, E.; Kiatkittipong, W.; Kiatkittipong, K.; Arpornwichanop, A. y Assabumrungrat, S. (2013) *Hydrogen production from catalytic supercritical water reforming of glycerol with cobalt-based catalysts*. Int. J. Hydrogen Energy 38: 4368-4379.
- Penfold, D.W., Forster, C.F. y Macaskie, L.E. (2003) *Increased hydrogen production by Escherichia coli strain HD 701 in comparison with wild-type strain MC4100*. Enzyme Microb. Technol. 33: 185-189.
- Penkova, A.; Bobadilla, L.; Ivanova, S.; Dominguez, M.I.; Romero-Sarria, F.; Roger, A.C.; Centeno, M.A. y Odriozola, J.A. (2011) *Hydrogen production by methanol*

- steam reforming on NiSn/MgO-Al₂O₃ catalysts: The role of MgO addition.* Appl. Catal. A-Gen. 392: 184-191.
- Peregrina Peña, P.M. (2000) *Empleo de superficies de respuesta para la solución de problemas de inventarios estocásticos.* Tesis de Licenciatura en Ingeniería Industrial, Universidad de las Américas Puebla, Escuela de Ingeniería, Cholula, México, p 37-70.
- Peterson, A.A.; Vontobel, P.; Vogel, F. y Tester, J.W. (2008) *In situ visualization of the performance of a supercritical-water salt separator using neutron radiography.* J. Supercrit. Fluids 43: 490-499.
- Pietrogrande, P. y Bezzeccheri, M. (1993) *Fuel processing.* En: *Fuel Cell Systems.* (Eds: Blomen, L.J.M.J. y Mugerwa, M.N.) Plenum Press, New York, U.S.A., p. 121-156.
- Pino Priego, A. (2009) *Aprovechamiento de Recursos Energéticos Renovables no Integrables en la Red Eléctrica. El Caso de la Producción de Hidrógeno.* Proyecto Final de Ingeniería, Universidad de Sevilla, Escuela Técnica Superior de Ingenieros, Sevilla, España, p. 8-25.
- Pintucci, C.; Giovannelli, A.; Traversi, M.L.; Ena, A.; Padovani, G. y Carlozzi, P. (2013) *Fresh olive mill waste deprived of polyphenols as feedstock for hydrogen photo-production by means of Rhodospseudomonas palustris 42OL.* Renew. Energy 51: 358-363.
- Plackett, R.L. (1972) *The discovery of the method of least squares.* Biometrika, 59: 239-251.
- Profeti, L.P.R.; Ticianelli, E.A. y Assaf E.M. (2009) *Production of hydrogen via steam reforming of biofuels on Ni/CeO₂-Al₂O₃ catalysts promoted by noble metals.* Int. J. Hydrogen Energy 34: 5049-5060.
- Qatibi, A.I.; Bories, A. y Garcia, J.L. (1991) *Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture.* Current. Microbiol. 22: 47-52.
- Ravindra, R. y Bhat, B.R. (2012) *Large scale synthesis of carbon nanofibres on sodium chloride support.* Nanomater. Nanotechnol. 2: 1-5
- Ramos, M.; Navascués, A.; García, L. y Bilbao, R. (2007) *Hydrogen production by catalytic steam reforming of acetol, a model compound of bio-oil.* Ind. Eng. Chem. Res. 46: 2399-2406.
- Ratnasamy, C. y Wagner, J.P. (2009) *Water gas shift catalysis.* Catal. Rev.-Sci. Eng. 51: 325-440.

- Reith, J.; Wijffels, R. y Barten, H. (2003) *Biomethane and biohydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production*. Dutch Biological Hydrogen Foundation, Hague, Netherlands, p 165.
- Ren, X.; Yu, D.; Han, S. y Feng, Y. (2006) *Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology*. *Bioresour. Technol.* 97: 2345-2349.
- REN21 Secretary. (2012) *Renewables 2012 - Global Status Report*. REN21, Paris, France. p. 31-39.
- Rennard, D.C.; Kruger, J.S. y Schmidt, L.D. (2009) *Autothermal catalytic partial oxidation of glycerol to syngas and to non-equilibrium products*. *ChemSusChem* 2: 89-98.
- Reungsang, A.; Sittijunda, S. y Angelidaki, I. (2013) *Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by Enterobacter aerogenes KCU-S1*. *Int. J. Hydrogen Energy* 38: 1813-1825.
- Rhodes, C.; Williams, B.P.; King, F. y Hutchings, G.J.(2002) *Promotion of Fe_3O_4/Cr_2O_3 high temperature water gas shift catalyst*. *Catal. Commun.* 3: 381-384.
- Roberts, M.F. (2005) *Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms*. *Saline Syst.* 1:5.
- Rodríguez, R. (2013) *Vectores Energéticos Asociados al Aprovechamiento de Energías Sustentables*. Jornada Energía y la UNC: el Papel de Nuestra Universidad Frente al Desafío Energético Regional, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, p 1-35.
- Roh, H.S.; Potdar, H.S. y Jun, K.W. (2004) *Carbon dioxide reforming of methane over co-precipitated Ni-CeO₂, Ni-ZrO₂ and Ni-Ce-ZrO₂ catalysts*. *Catal. Today* 93-95: 39-44.
- Rojas, A.; Barraza, J. y Barranco, R. (2010) *Cambios morfológicos de carbones pulverizados durante su desvolatilización*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 52: 75-87.
- Rossmann, R.; Sawers, G. y Böck, A. (1991) *Mechanism of regulation of the formate-hydrogen lyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon*. *Mol. Microbiol.* 5: 2807-2814.
- Rostrup-Nielsen J.R. (2001) *Conversion of hydrocarbons and alcohols for fuel cells*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3: 283-288.
- Rostrup-Nielsen, J.R.; Sehested, J. y Norskov, J.K. (2002) *Hydrogen and synthesis gas by steam- and CO₂ reforming*. *Adv. Catal.* 47: 65-139.

- Runnalls, O.J.C. y Mackay, D. (1999). *Crecimiento de la Energía*. En: *Ingeniería Ambiental* (Eds: Henry, J.G. y Heinke, G.W.) Prentice Hall, Naucalpan de Juárez, México, p. 49-84.
- Rynkowski, J.M.; Paryjczak, T. y Lenik, M. (1993) *On the nature of oxidic nickel phases in NiO/ γ -Al₂O₃ catalysts*. Appl. Catal. A-Gen. 106: 73-82.
- Rynkowski, J.M.; Paryjczak, T. y Lenik, M. (1995) *Characterization of alumina supported nickel-ruthenium systems*. App. Catal. A-Gen. 126: 257-271.
- Sanchez, E.A. (2010) *Preparación, caracterización y evaluación de catalizadores para producir hidrógeno a partir de glicerol*. Tesis de Licenciatura en Biotecnología, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina.
- Sánchez, N.M. (2011) *Obtención de hidrógeno mediante reformado catalítico de nafta con vapor de agua*. Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Valencia, Instituto de Tecnología Química, Valencia, España, p. 15-144.
- Sanchez-Torres, V.; Mohd Yusoff, M.Z.; Nakano, C.; Maeda, T.; Ogawa, H.I. y Wood, T.K. (2013) *Influence of Escherichia Coli hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol*. Int. J. Hydrogen Energy 38: 3905-3912.
- San Miguel, G.; Dufour, J.; Calles, J.A. y Botas J.A. (2006) *La Economía del Hidrógeno. Una Visión Global sobre la Revolución Energética del Siglo XXI - 2. Aplicaciones Convencionales del Hidrógeno y Pilas de Combustible*. Acta Cient. Technol. 10: 21-27.
- Sarma, S.J.; Dhillon, G.S.; Brar, S.K.; Bihan, Y.L.; Buelna, G. y Verma, M. (2013) *Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by Enterobacter aerogenes NRRL B-407*. Renew. Energy 60: 566-571.
- Scheffer, B.; Molhoek, P. y Moulijn, J.A. (1989) *Temperature-programmed reduction of NiO single bond WO₃/Al₂O₃ hydrodesulphurization catalysts*. Appl. Catal. A-Gen. 46: 11-30.
- Secretaría de Energía. (2010) *Resolución 554/2010: Ratifícase la Addenda al Acuerdo de Abastecimiento de Biodiesel para su mezcla con combustibles fósiles en el Territorio Nacional, suscripta el 5 de julio de 2010. Modifícase la Resolución N° 7/2010*. Buenos Aires, Argentina.
- Secretaria de Energía (2013) *Resolución 1125/2013: Empresas Encargadas de Realizar Mezclas de Combustibles Fósiles con Biodiesel*. Buenos Aires, Argentina.
- Seifert, K.; Waligorska, M.; Wojtowski, M. y Laniecki, M. (2009) *Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process*. Int. J. Hydrogen Energy 34:

- Selembo, P.A.; Perez, J.M.; Lloyd, W.A. y Logan, B.E. (2009) *Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures*.
- Self, W.T.; Hasona, A. y Shanmugam, K.T. (2004) *Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186: 580-587.
- Semelsberger, T.A.; Brown, L.F.; Borup, R.L. y Inbody, M.A. (2004) *Equilibrium products from autothermal processes for generating hydrogen-rich fuel-cell feeds*. Int. J. Hydrogen Energy 29 1047-1064.
- Seo, J.G.; Youn, M.H.; Park, S.; Chung, J.S. y Song, I.K. (2009) *Hydrogen production by steam reforming of liquefied natural gas (LNG) over Ni/Al₂O₃-ZrO₂ xerogel catalysts: effect of calcination temperature of Al₂O₃-ZrO₂ xerogel supports*. Int. J. Hydrogen Energy 34: 3755-3763.
- Seo, Y.S.; Jung, Y.S.; Yoon, W.L.; Jang, I.G. y Lee T.W. (2011) *The effect of Ni content on a highly active Ni-Al₂O₃ catalyst prepared by the homogeneous precipitation method*. Int. J. Hydrogen Energy 36: 94-102.
- Shen, L.; Yin, H.; Wang, A.; Lu, X. y Zhang C. (2014) *Gas phase oxidehydration of glycerol to acrylic acid over Mo/V and W/V oxide catalysts*. Chem. Eng. J. 244 168-177.
- Sheppard, N. y de la Cruz, C. (1996) en: Eley, D.D.; Haag, W.O. y Gates B. (Eds.), *Vibrational Spectra of Hydrocarbons Adsorbed on Metals*. Advances in Catalysis, vol. 41, Academic Press, London, U.K., p. 623.
- Shiloach, J. y Fass, R. (2005) *Growing E. coli to high cell density-A historical perspective on method development*. Biotechnol. Adv. 23: 345-357.
3671-3678.
- Silverwood, P.; Hamilton, N.; Staniforth, J.; Laycock, C.; Parker, S.; Ormerod, R. y Lennon, D. (2010) *Persistent species formed during the carbon dioxide reforming of methane over a nickel-alumina catalyst*. Catal. Today 155: 319-325.
- Silvey, L.G. (2011) *Hydrogen and Syngas Production from Biodiesel Derived Crude Glycerol*. Tesis de Maestría, University of Kansas, School of Engineering, Lawrence, U.S.A. p. 4-28.
- Sittijunda, S. y Reungsang, A. (2012) *Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 15473-15482.
- Skoog, D.A. y Leary, J.J. (1994) *Análisis Instrumental*. X Edición, McGraw Hill Interamericana, Madrid, España, p 674-703.

- Slinn, M.; Kendall, K.; Mallon, C. y Andrews, J. (2008) *Steam reforming of biodiesel by-product to make renewable hydrogen*. *Bioresour. Technol.* 99: 5851-5858.
- Smith, W.J. (2007) *Mapping the Development of UK Biorefinery Complexes*. The National Non-Food Crops Centre. York, U.K., p. 33-64.
- Soares, R.R., Simonetti D.A. y Dumesic J.A. (2006) *Glycerol as a source for fuels and chemicals by low-temperature catalytic processing*. *Angewandte Chemie* 118: 4086-4089.
- Song, C. (2002) *Fuel processing for low-temperature and high temperature fuel cells: challenges, and opportunities for sustainable development in the 21st century*. *Catal. Today* 77: 17-49.
- Song, H.; Zhang, L.; Watson, R.B.; Braden, D. y Ozkan, U.S. (2007) *Investigation of bio-ethanol steam reforming over cobalt based catalysts*. *Catal. Today* 129: 346-354.
- Srisiriwat, N.; Therdthianwong, S. y Therdthianwong, A. (2009) *Oxidative steam reforming of ethanol over Ni/Al₂O₃ catalysts promoted by CeO₂, ZrO₂ and CeO₂-ZrO₂*. *Int. J. Hydrogen Energy* 34: 2224-2234.
- Stein, Y.S.; Antal, M.J. y Jones, M. (1983) *A study of the gas-phase pyrolysis of glycerol*. *J. Anal. App. Pyrol.* 4: 283-296.
- Steinfeld, A. (2005) *Solar thermochemical production of hydrogen - A review*. *Sol. Energy* 78: 603-615.
- Stoilova, D.; Koleva, V. y Cheshkova, K. (2002) *Infrared Spectroscopic Study of NO and NH₃ Adsorption on Alumina-Supported Nickel Oxide Catalysts*. *Z. Phys. Chem.* 216: 737-747.
- Sundari, R. y Vaidya, P.D. (2012) *Reaction kinetics of glycerol steam reforming using a Ru/Al₂O₃ catalyst*. *Energy Fuels* 26: 4195-4204.
- Suhaimi, S.N.; Phangl, L.Y.; Maeda, T.; Abd-Azizl, S.; Wakisaka, M.; Shirai, Y. y Hassan, M.A. (2012) *Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated Escherichia Coli SS1*. *Braz. J. Microbiol.* 43: 506-516.
- Swami, S.M. y Abraham, M.A. (2006) *Integrated catalytic process for conversion of biomass to hydrogen*. *Energy Fuel* 20: 2616-2622.
- Tabandeh, F.; Khodabandeh, M. y Yakhchali, B. (2008) *Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture*. *Chem. Eng. Sci.* 63: 2477-2483.

- Talmadge, M.; Dutta, A. y Bain, R. (2013) *Techno-economic and Market Analysis of Pathways from Syngas to Fuels and Chemicals*. III International Conference on Thermochemical Conversion of Biomass, Chicago, U.S.A. p. 1-32.
- Tang, X.; Tan, Y.; Zhu, H.; Zhao, K. y Shen, W. (2009) *Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1628-1634.
- Temudo, M.F.; Poldermans, R.; Kleerebezem, R. y van Loosdrecht, M.C.M. (2008) *Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: a chemostat study*. Biotechnol Bioeng 100: 1088-1098.
- Trchounian, K.; Sanchez-Torres, V.; Wood, T.K. Y Trchounian, A. (2011) *Escherichia Coli hydrogenase activity and H₂ production under glycerol fermentation at a low pH*. Int. J. Hydrogen Energy 36: 4323-4331.
- Trimm, D.L. (1999) *Catalysts for the control of coking during steam reforming*. Catal. Today 49: 3-10.
- Trombetta, M.; Busca, G.; Rossini, S.; Piccoli, V. y Cornaro, U. (1997) *FT-IR Studies on Light Olefin Skeletal Isomerization Catalysis: II. The Interaction of C₄ Olefins and Alcohols with HZSM5 Zeolite*. J. Catal. 168: 349-363.
- Tsygankov, A.A.; Kosourov, S.N.; Tolstygina, I.V.; Ghirardi, M.L. y Seibert, M. (2006) *Hydrogen production by sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii under photoautotrophic conditions*. Int. J. Hydrogen Energy 31: 1574-1584.
- Turek, A.; Wachs, I. y De Canio, E. (1992) *Acidic properties of alumina-supported metal oxide catalysts: an infrared spectroscopy study*. J. Phys. Chem. 96: 5000-5007.
- Turner, J.; Sverdrup, G.; Mann, M.K.; Maness, P.C., Kroposki, B.; Ghirardi, M, Evans, R.J. y Blake, D. (2008) *Renewable hydrogen production*. Int. J. Energy Res. 32 379-407.
- Urasaki, K.; Sekine, Y.; Kawabe, S.; Kikuchi, E. y Matsukata, M. (2005) *Catalytic activities and coking resistance of Ni/perovskites in steam reforming of methane*. Appl. Cat. A-Gen. 286: 23-29.
- U.S. Environmental Protection Agency (2007) *EPA420-F-07-019: EPA Finalizes Regulations for a Renewable Fuel Standard (RFS) Program for 2007 and Beyond*. Washington D.C., U.S.A.
- Valentini, A.; Dias Probst, L.F.; Carreño, N.L.V.; Leite, E.R.; Pontes F.M.; Longo, E.; Schreiner W.H. y Lisboa-Filho, P.N. (2003) *Estudo microestrutural do catalisador*

- Ni/g-Al₂O₃ - Efeito da adição de CeO₂ na reforma do metano com dióxido de carbono.* Quim. Nova 26: 648-654.
- Valle Pereña, J.A. y Ortega Navarro H.O. (2012). *Prospectiva de Energías Renovables 2012-2026*. Secretaría de Energía. México D.F., México. p. 25-52.
- Valliyappan, T.; Ferdous, D.; Bakhshi, N.N. y Dalai, A.K. (2008) *Production of hydrogen and syngas via steam gasification of glycerol in a fixed-bed reactor*. Top. Catal. 49: 59-67.
- van Bennekom, J.G.; Venderbosch, R.H., Assink, D. y Heeres, H.J. (2011) *Reforming of methanol and glycerol in supercritical water*. J. Supercrit. Fluids 58: 99-113.
- van Bennekom, J.G.; Venderbosch, R.H. y Heeres, H.J. (2012a) *Biomethanol from Glycerol*. En: *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*. (Ed: Fang, Z.) InTech, Rijeka, Croatia, p. 331-361.
- van Bennekom, J.G.; Kirillov, V.A.; Amosov, Y.I.; Krieger, T.; Venderbosch, R.H., Assink, D.; Lemmensd, K.P.J. y Heeres, H.J. (2012b) *Explorative catalyst screening studies on reforming of glycerol in supercritical water*. J. Supercrit. Fluids 70: 171-181.
- van der Drift, A. y Boerrigter, H. (2005) *Synthesis Gas from Biomass for Fuels and Chemicals*. En: *Workshop in Hydrogen and Synthesis Gas for Fuels and Chemicals*, I International Conference on Second-Generation Automotive Biofuels (SYNBIOS), Stockholm, Sweden, p. 7-28.
- Vardar-Schara, G.; Maeda, T. y Wood, T.K. (2008) *Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation*. Microb. Biotechnol. 1: 107-125.
- Varrone, C.; Giussani, B.; Izzo, G.; Massini, G.; Marone, A.; Signorini, A.; Wang, A. (2012) *Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture*. Int. J. Hydrogen Energy 37: 16479-16488.
- Vaudry, F.; Khodabandeh, S. y Davis M. (1996) *Synthesis of pure alumina mesoporous materials*. Chem. Mater. 8: 1451-1464.
- Vicente, G.; Martínez, M. y Aracil J. (2004) *Integrated biodiesel production: a comparison of homogeneous catalysts systems*. Bioresour. Technol. 92: 297-305.
- Vikromvarasiri, N.; Laothanachareon, T.; Champreda, V. y Pisutpaisal, N. (2014) *Bioethanol production from glycerol by mixed culture system*. Energy Procedia 61: 1213-1218.

- Wang, X.; Wang, N.; Li, M.; Li, S.; Wang, S. y Ma, X. (2010) *Hydrogen production by glycerol steam reforming with in situ hydrogen separation: A thermodynamic investigation*. Int. J. Hydrogen Energy 35: 10252-10256.
- Wang, Y.; Zhu, A.; Zhang, Y.; Au, C.T.; Yang, X. y Shi, C. (2008) *Catalytic reduction of NO by CO over NiO/CeO₂ catalyst in stoichiometric NO/CO and NO/CO/O₂ reaction*. Appl. Catal. B. Environ. 81: 141-149.
- Watkins, K. (2005) *Informe sobre Desarrollo Humano. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo*. Mundi-Prensa Libros S.A., Madrid, España, p. 313-316.
- Wawrzetz, A.; Peng, B.; Hrabar, A.; Jentys, A.; Lemonidou, A.A. y Lercher J.A. (2010) *Towards understanding the bifunctional hydrodeoxygenation and aqueous phase reforming of glycerol*. J. Catal. 269: 411-420.
- Wei, J. e Iglesia, E. (2004) *Isotopic and kinetic assessment of the mechanism of reactions of CH₄ with CO₂ or H₂O to form synthesis gas and carbon on nickel catalysts*. J Catal 224: 370-383.
- Wen, G.; Xu, Y.; Ma, H.; Xu, Z. y Tian, Z. (2008) *Production of hydrogen by aqueous-phase reforming of glycerol*. Int. J. Hydrogen Energy 33: 6657-6666.
- Werpy, T. y Petersen, G. (2004) *Top Value Added Chemical from Biomass*; U.S. Department of Energy, Washington, U.S.A., p 76.
- Wilkins, E.; Ringel, A.K.; Hortig, D.; Willke, T. y Vorlop, K.D. (2012) *High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by Clostridium butyricum AKR102a*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 1057-1063.
- Wolf-Dieter, D. (1995) *Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol*. FEMS Microbiol. Rev. 16: 143-149.
- Wu, K.J.; Lin, Y.H.; Lo, Y.C.; Chen, C.Y.; Chen, W.M. y Chang, J.S. (2011) *Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a Klebsiella sp. HE1 strain via anaerobic fermentation*. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 42: 20-25.
- Xu, G.; Shi, K.; Gao, Y.; Xu, H.; Wei, Y. (1999) *Studies of reforming natural gas with carbon dioxide to produce synthesis gas X. The role of CeO₂ and MgO promoters*. J. Mol. Catal. A: Chem. 147: 47-54.
- Yang, G.; Tian, J. y Li, J. (2007) *Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of Klebsiella oxytoca under microaerobic conditions*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 1017-1024.
- Yazdani, S.S. y Gonzalez, R. (2007) *Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry*. Curr. Opin. Biotechnol. 18: 213-219.

- Yazdani, S.S. y Gonzalez, R. (2008) *Engineering Escherichia coli for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products*. Metab. Eng. 10: 340-351.
- Yin, X.; You, Q. y Jiang, Z. (2011) *Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from Tricholoma matsutake by response surface methodology*. Carbohydr. Polym. 85: 1358-1364.
- Youn, M.H.; Seo, J.G.; Kim, P.; Kim, J.J.; Lee, H.I. y Song, I.K. (2006) *Hydrogen production by auto-thermal reforming of ethanol over Ni/ γ -Al₂O₃ catalysts: effect of second metal addition*. J. Power Sources 162: 1270-1274.
- Yu, C.; Ge, Q.; Xu, H. y Li, W. (2006) *Effects of Ce addition on the Pt-Sn/ γ -Al₂O₃ catalyst for propane dehydrogenation to propylene*. Appl. Catal. A-Gen. 315: 58-67.
- Yuwa-amornpitak, T. (2012) *Bio-hydrogen production from biodiesel glycerol waste from used oil by bacterium isolated from waste water sludge*. J. Environ. Sci. Technol 25: 373-380.
- Zangouei, M.; Moghaddam, A.Z. y Arasteh, M. (2010) *The influence of nickel loading on reducibility of NiO/Al₂O₃ catalysts synthesized by sol-gel method*. Chem. Eng. Res. Bull. 14: 97-102.
- Zhang, B.; Tang, X.; Li, Y.; Xu, Y. y Shen, W. (2007) *Hydrogen production from steam reforming of ethanol and glycerol over ceria-supported metal catalysts*. Int. J. Hydrogen Energy 32: 2367-2373.
- Zhang, L. y Melis, A. (2002) *Probing green algal hydrogen production*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 357: 1499-1509.
- Zhang, T.; Liu, H. y Fang, H. (2003) *Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition*. J. Environ. Manage. 69: 149-156. Biotechnol. Bioeng. 104: 1098-1106.
- Zhang, X.; Shanmugam, K.T. e Ingram, L.O. (2010) *Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 76: 2397-2401.
- Zhang, Y.; Li, Y.; Du, C.; Liu, M. y Cao, Z. (2006) *Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by Klebsiella pneumoniae*. Metab. Eng. 8: 578-586.
- Zeng, A.P.; Biebl, H.; Schlieker, H. y Deckwer, W.D. (1993) *Pathway analysis of glycerol fermentation by Klebsiella pneumoniae: Regulation of reducing equivalent balance and product formation*. Enzyme Microb. Technol. 15: 770-779.

- Zhilina, T.N.; Zavarzin, G.A.; Bulygina, E.S.; Kevbrin, V.V.; Osipov, G.A. y Chumakov, K.M. (1992) *Ecology, physiology and taxonomy studies on a new taxon of Haloanaerobiaceae, Haloincola saccharolytica gen. nov., sp. nov.* Syst. Appl. Microbiol. 15: 275-284.
- Zhou, C.H.; Beltramini, J.N.; Fan, Y.X. y Lu, G.Q. (2008) *Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals.* Chem. Soc. Rev. 37: 527-549.
- Zhu, X.; Huo, P.; Zhang, Y.; Cheng, D. y Liu, C. (2008) *Structure and reactivity of plasma treated Ni/Al₂O₃ catalyst for CO₂ reforming of methane.* Appl. Catal. B-Environ. 81: 132-140.
- Zverlov, V.V.; Berezina, O.; Velikodvorskaya, G.A. y Schwarz, W.H. (2006) *Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 587-597.