

**PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO (ATA) A
PARTIR DE VINAZAS RESIDUALES A ESCALA SEMIPILOTO**

Katherine Apache Roa



Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Química Farmacéutica

2018

**PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO (ATA) A
PARTIR DE VINAZAS RESIDUALES A ESCALA SEMIPILOTO**

Katherine Apache Roa

Trabajo de grado para optar por el título de Pregrado en Química Farmacéutica

Director

Ph.D. Guillermo León Montoya Peláez

Santiago de Cali

2018



APROBADO POR:

Ma. Francisca Villegas
Ph.D. María Francisca Villegas Torres
Evaluadora

Guillermo León Montoya Peláez
Ph.D. Guillermo León Montoya Peláez
Tutor del Proyecto

**"Quien no se resuelve a cultivar el
hábito de pensar, se pierde el mayor
placer de la vida"**

Thomas Alva Edison (1847-1931)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitir llegar hasta esta etapa de mi vida y ser mi acompañante fiel en todo el proceso.

A mi madre Leyda Roa, por su escucha, su cariño, el esfuerzo en su trabajo, por preocuparse por mi alimentación, sueño y bienestar durante todo mi proceso educativo.

A mi padre Hernando Apache, por su compañía en cada paso, por su trabajo arduo, trasnochadas y por sus constantes consejos.

A mi hermano Camilo Apache, por ser mi mejor amigo, mi compañía, mi aliado, por escucharme y ayudarme para que todo este proceso fuera posible.

A mi tutor, Ph.D. Guillermo L. Montoya, por su confianza y entrega a este proyecto, por enseñarme a buscar soluciones y trabajar de manera eficaz.

A los asistentes del Laboratorio de Productos Naturales, en especial a Juan David Giraldo, por su entrega total a este proyecto, por su dedicación, constancia y apoyo.

A la evaluadora de este proyecto, Ph.D. María Francisca Villegas, por su tiempo y dedicación en lectura, revisión y corrección.

A mis demás docentes de la Universidad Icesi, por sembrar en mi la curiosidad de aprender por sí misma y por ser guías en todo el proceso educativo.

A mis amigos de vida y carrera, especialmente a Lyanne Delgado, por su ayuda en escritura, su apoyo constante y su amistad. Y a todos los demás por alegrarme en los días estresados y por realizar este proceso conmigo.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| LISTA DE TABLAS | 8 |
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| LISTA DE ANEXOS | 12 |
| 1. RESUMEN..... | 13 |
| 2. ABSTRACT..... | 14 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO..... | 16 |
| 4.1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 16 |
| 4.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE | 17 |
| 4.2.1. INDUSTRIA AZUCARERA EN COLOMBIA..... | 17 |
| 4.2.2. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL | 18 |
| 4.2.2.1. RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL | 19 |
| 4.2.3. VINAZA..... | 20 |
| 4.2.4. ÁCIDO ACONÍTICO..... | 21 |
| 4.2.4.1. ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO | 22 |
| 4.2.4.1.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN..... | 22 |
| 4.2.4.1.1.1. EXTRACCIÓN A ESCALA SEMIPILOTO | 24 |
| 4.2.4.1.1.2. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN..... | 25 |
| 5. OBJETIVOS..... | 25 |
| 5.1. OBJETIVO GENERAL..... | 25 |
| 5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 25 |
| 6. METODOLOGÍA | 26 |
| 6.1. REACTIVOS EMPLEADOS..... | 26 |
| 6.2. MATERIALES Y EQUIPOS | 26 |
| 6.3. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA | 26 |
| 6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA DETERMINAR LA RELACIÓN MÁSCA (VINAZA: ACOET)..... | 27 |
| 6.4.1. Experimento 1: Relación 1:2 (muestra vinaza: ACOET) | 28 |
| 6.4.2. Experimento 2: Relación 1: 5 (muestra vinaza: ACOET) | 28 |
| 6.4.3. Experimento 3: Relación 1:10 (muestra vinaza: ACOET) | 28 |
| 6.4.4. Experimento 4: Relación 1:20 (muestra vinaza: ACOET) | 28 |
| 6.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO EN PLANTA SEMIPILOTO | 29 |
| 6.5.1. CARGA DEL SISTEMA..... | 30 |
| 6.5.2. RECOLECCIÓN DE LAS FASES | 31 |
| 6.5.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 6.5.3.1. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA Y RECOLECCIÓN DEL SOLVENTE | 31 |
| 6.5.3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE LA FASE ORGÁNICA CONCENTRADA..... | 31 |
| 6.6. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO POR HPLC | 31 |
| 6.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA HPLC | 33 |
| 6.7. MATRIZ DE MARCO LÓGICO | 33 |
| 7. RESULTADOS..... | 36 |
| 7.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA..... | 36 |
| 7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA DETERMINAR LA RELACIÓN MÁSCA (VINAZA: SOLVENTE) | 38 |
| 7.2.1. EXPERIMENTO 1 (RELACIÓN 1:2)..... | 39 |
| 7.2.2. EXPERIMENTO 2 (RELACIÓN 1:5)..... | 44 |
| 7.2.3. EXPERIMENTO 3 (RELACIÓN 1:10)..... | 49 |
| 7.2.4. EXPERIMENTO 4 (RELACIÓN 1:20)..... | 53 |
| 7.3. EXTRACCIÓN A ESCALA SEMIPILOTO..... | 59 |
| 7.3.1. PRIMERA EXTRACCIÓN EN PLANTA SEMIPILOTO..... | 59 |
| 7.3.2. SEGUNDA EXTRACCIÓN EN PLANTA SEMIPILOTO..... | 62 |
| 7.3.3. TERCERA EXTRACCIÓN EN PLANTA SEMIPILOTO | 64 |
| 8. DISCUSIÓN | 66 |
| 9. CONCLUSIONES | 70 |
| 10. RECOMENDACIONES..... | 70 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 71 |
| 12. ANEXOS | 73 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Nombre, casa comercial y pureza de los reactivos empleados para el desarrollo del trabajo de investigación..... | 26 |
| Tabla 2. Resultados obtenidos al realizar el experimento 1 (relación 1:2 - vinaza: ACOET) | 39 |
| Tabla 3. Resultados en términos de porcentaje de ATA obtenido en el experimento 1 (relación 1:2) en la F.A..... | 43 |
| Tabla 4. Resultados en términos de porcentaje de ATA obtenido en el experimento 1 (relación 1:2) en la F.O. | 43 |
| Tabla 5. Resultados obtenidos al realizar el experimento 2 (relación 1:5 - vinaza: ACOET) | 44 |
| Tabla 6. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 2 (relación 1:5) en la F.A..... | 48 |
| Tabla 7. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 3 (relación 1:5) en la F.O. | 48 |
| Tabla 8. Resultados obtenidos al realizar el experimento 3 (relación 1:10 - vinaza: ACOET) | 49 |
| Tabla 9. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 3 (relación 1:10) en la F.A..... | 53 |
| Tabla 10. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 3 (relación 1:10) en la F.O..... | 53 |
| Tabla 11. Resultados obtenidos al realizar el experimento 4 (relación 1:20 - vinaza: ACOET). | 53 |
| Tabla 12. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 4 (relación 1:20) en la F.A. | 57 |
| Tabla 13. resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 4 (relación 1:20) en la F.O. | 57 |
| Tabla 14. resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en las tres extracciones realizadas a escala semipiloto..... | 66 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ubicación geográfica del sector azucarero en Colombia. (ASOCAÑA, 2017) | 17 |
| Figura 2. Distribución de las áreas sembradas de caña de azúcar según la propiedad de los terrenos. (ASOCAÑA, 2017) | 18 |
| Figura 3. Proceso de producción de Bioetanol. (ASOCAÑA, 2017)..... | 20 |
| Figura 4. Compuestos orgánicos presentes en la vinaza. (García y Rojas, 2005)..... | 21 |
| Figura 5. (A) Estructura del ácido cis-aconítico, (B) Estructura del ácido trans-aconítico; (a, b y c), representan los hidrógenos ionizables de cada uno. Los pKa respectivamente son: 2,8 (a), 4,6 (b) y 6,3 (c). (Gil, 2007) | 22 |
| Figura 6. Tabla comparativa del rendimiento y pureza obtenida para la extracción de ATA con acetato de etilo a diferentes tiempos y temperaturas. (Gil, 2007) | 23 |
| Figura 7. Rendimiento de extracción del ácido trans-aconítico con diferentes solventes y condiciones de pH. (Zapata, 2007) | 23 |
| Figura 8. Comparación de la pureza del ácido trans-aconítico en diferentes solventes y condiciones de pH. (Zapata, 2007) | 24 |
| Figura 9. Representación de la extracción líquido-líquido. (Muller, 2002)..... | 24 |
| Figura 10. Proceso de recolección de la muestra de vinaza proveniente del Ingenio Manuelita. | 27 |
| Figura 11. Montaje para el diseño experimental realizado para determinar la relación másica (vinaza: acetato de etilo) óptima. | 29 |
| Figura 12. Esquema general de la planta semipiloto de la Universidad ICESI. (Cruz y Villegas, 2016) | 30 |
| Figura 13. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra proveniente del Ingenio Manuelita con un pH de 4,42..... | 37 |
| Figura 14. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra llevada a pH 2,08..... | 38 |
| Figura 15. Fases obtenidas al realizar el experimento 1 (relación 1:2) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 39 |
| Figura 16. Fases obtenidas al realizar el experimento 1 (relación 1:2) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 39 |
| Figura 17. Fases obtenidas al realizar el experimento 1 (relación 1:2) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 40 |
| Figura 18. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 1, repetición 1..... | 40 |
| Figura 19. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 1, repetición 1. | 41 |
| Figura 20. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 1, repetición 2..... | 41 |
| Figura 21. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 1, repetición 2. | 41 |

| | |
|--|----|
| Figura 22. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 1, repetición 3..... | 42 |
| Figura 23. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 1, repetición 3. | 42 |
| Figura 24. Fases obtenidas al realizar el experimento 2 (relación 1:5) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 44 |
| Figura 25. Fases obtenidas al realizar el experimento 2 (relación 1:5) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 44 |
| Figura 26. Fases obtenidas al realizar el experimento 2 (relación 1:5) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 45 |
| Figura 27. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 2, repetición 1..... | 45 |
| Figura 28. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 2, repetición 1. | 46 |
| Figura 29. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 2, repetición 2..... | 46 |
| Figura 30. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 2, repetición 2. | 47 |
| Figura 31. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 2, repetición 3..... | 47 |
| Figura 32. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 2, repetición 3. | 48 |
| Figura 33. Fases obtenidas al realizar el experimento 3 (relación 1:10) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 49 |
| Figura 34. Fases obtenidas al realizar el experimento 3 (relación 1:10) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 49 |
| Figura 35. Fases obtenidas al realizar el experimento 3 (relación 1:10) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 50 |
| Figura 36. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 3, repetición 1..... | 50 |
| Figura 37. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 3, repetición 1. | 51 |
| Figura 38. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 3, repetición 2..... | 51 |
| Figura 39. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 3, repetición 2. | 51 |
| Figura 40. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 3, repetición 3..... | 52 |
| Figura 41. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 3, repetición 3. | 52 |
| Figura 42. Fases obtenidas al realizar el experimento 4 (relación 1:20) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 53 |
| Figura 43. Fases obtenidas al realizar el experimento 4 (relación 1:20) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A..... | 54 |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Figura 44. Fases obtenidas al realizar el experimento 4 (relación 1:20) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A. | 54 |
| Figura 45. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 4, repetición 1. | 55 |
| Figura 46. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 4, repetición 1. | 55 |
| Figura 47. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 4, repetición 2. | 55 |
| Figura 48. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 4, repetición 2. | 56 |
| Figura 49. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 4, repetición 3. | 56 |
| Figura 50. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O. obtenida del experimento 4, repetición 3. | 56 |
| Figura 51. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase orgánica seca (biomasa de ATA) de la extracción 1 a escala semipiloto. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 52. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase acuosa de la extracción 1 a escala semipiloto. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 53. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase orgánica seca (biomasa de ATA) de la extracción 2 a escala semipiloto. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 54. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase orgánica seca (biomasa ATA) de la extracción 3 a escala semipiloto. | 65 |
| Figura 55. Biomasa de ATA obtenida de las tres extracciones a escala semipiloto realizadas. (1), (2) y (3) Biomasa de ATA obtenida de las extracciones 1, 2 y 3, respectivamente. | 66 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO 1. Protocolo de extracción de ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto..... | 73 |
|--|----|

1. RESUMEN

La vinaza es el principal subproducto de la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar y es producido en gran abundancia, por lo que las investigaciones guiadas a brindar un uso alternativo y sostenible han sido una prioridad en los últimos años. En este sentido, el enfoque del Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Icesi está dirigido a la extracción de productos químicos de alto valor a partir de recursos renovables, desarrollando tecnologías de procesamiento eficientes que se consoliden en oportunidades económicas para la región. En el proyecto actual pretendemos establecer las condiciones para la extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA) otorgándole un uso sostenible a la vinaza. El ácido trans-aconítico, es un compuesto químico de alto interés comercial para la industria de polímeros debido a su capacidad para generar agentes entrecruzantes y plastificantes. El método de valoración e identificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) de ATA y las condiciones de extracción líquido-líquido empleando como solvente acetato de etilo a escala laboratorio fueron determinadas en proyectos anteriores; obteniéndose tres condiciones de extracción: muestra de vinaza con pH 2.0, temperatura de 20°C - 25°C y tiempo de extracción de 3 horas en agitación constante.

En este proyecto, se empleó la planta de extracción semipiloto de la Universidad Icesi, para establecer las condiciones de extracción de ácido trans-aconítico mediante la extrapolación de las condiciones obtenidas a escala laboratorio mencionadas anteriormente y la estimación de la relación másica óptima en términos del volumen de muestra (vinaza) y solvente (acetato de etilo). La relación másica se obtuvo a través de un diseño experimental a escala de laboratorio de cuatro test en los cuales se modificó la cantidad de muestra y solvente, respectivamente, y se cuantificó el contenido de ATA por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) de cada fase obtenida. Se definió como relación másica óptima la relación 1:5 (experimento 2) con un rendimiento en promedio de ATA del 28,05%. Seguidamente, con el fin de asegurar la reproducibilidad del procedimiento, se realizaron tres ensayos de extracción del ácido trans-aconítico a escala semipiloto obteniendo un rendimiento promedio de 31,25% de ATA, con una desviación estándar relativa (RSD) de 36,00%. Finalmente, se fijaron las condiciones de extracción a escala semipiloto así: muestra de vinaza pH 2,0, temperatura de 20°C -25°C, tiempo de extracción 3 horas en agitación y relación másica 1:5. Además, teniendo en cuenta estas condiciones se elaboró un protocolo de extracción de ácido trans-aconítico a escala semipiloto, contribuyendo así al desarrollo de la bioprospección de productos naturales en el país y aprovechamiento de residuos industriales.

Palabras clave: ácido trans-aconítico, condiciones de extracción líquido a líquido, escala semi piloto, HPLC, vinaza.

2. ABSTRACT

Vinasse is the main by-product of bioethanol production and sugar production and production in large quantities so that research has been put to alternative and sustainable use has been a priority in recent years. In this regard, the focus of the Research Group on Natural Products of the ICESI University is aimed at the extraction of high-value chemical products from renewable resources for efficient processing technologies that consolidate economic opportunities for the region. In the current project, we aimed to establish the conditions for the semi-pilot scale extraction of trans-aconitic acid (ATA) from vinasse, developing a sustainable use of this residue. Trans-aconitic acid is a chemical composed of high commercial interest for the polymer industry due to its capacity to generate cross-linking agents and plasticizers. The method of identification by High-Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) and liquid-liquid extraction conditions that use as solvent ethyl acetate to scale obtaining three extraction conditions: vinasse sample with pH 2.0, a temperature of 20 ° C -25 ° C and extraction time of 3 hours in constant agitation.

In this project, the semi-pilot extraction plant of the ICESI University was used to establish the trans-aconitic acid extraction conditions by extrapolating the laboratory-scale conditions mentioned above and estimating the optimum mass ratio in terms of the sample volume (vinasse) and solvent (ethyl acetate). The mass ratio was obtained through an experimental design at a laboratory scale of four tests in which the amount of sample and solvent was modified, respectively, and the trans-aconitic acid content was quantified by High-Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) of each phase obtained. The 1: 5 ratio was defined as the optimal mass ratio (experiment 2) with a yield of 28,05% ATA. Then, to ensure the reproducibility of the procedure, three trans-aconitic acid extraction tests were carried out on a semi-pilot scale obtaining an average yield of 31,25%, with a relative standard deviation (RSD) of 36,00 %. Finally, the extraction conditions were set on a semi-pilot scale, such as vinasse sample pH 2.0, a temperature of 20 ° C -25 ° C, extraction time 3 hours in agitation and 1: 5 mass ratio. In addition, a trans-aconitic acid extraction protocol was developed, thus contributing to the development of the bioprospecting of natural products in the country and the use of industrial waste.

Key words: trans-aconitic acid, liquid-liquid extraction conditions, semi pilot scale, HPLC, vinasse.

3. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar se utiliza preferiblemente para la producción de azúcar y una vez realizada dicha producción se generan componentes (mieles) que pueden ser usadas como fuente o materia prima para la producción de Bioetanol, un compuesto utilizado actualmente como alternativa a los combustibles fósiles. Emplear el bioetanol como combustible confiere la ventaja de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (ej. CO₂), además, al ser un compuesto biodegradable es amigable con el medio ambiente, el 85% se degrada en aproximadamente 28 días, mientras que los combustibles fósiles pueden durar años para degradarse (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2013).

Si bien el bioetanol es un compuesto que reduce el efecto invernadero, la producción de éste a su vez genera un gran volumen de residuos de vinaza. Según el Grupo de Investigación en Eficiencia Energética y Energías Alternativas (GEAL) de la Sede Palmira de la Universidad Nacional de Colombia, durante el 2011 los ingenios azucareros del Valle Geográfico del Río Cauca produjeron 351 millones de litros de bioetanol al programa de alcohol carburante colombiano, los cuales generaron como residuo alrededor de 877,5 millones de litros de vinaza, (Centro de desarrollo UNIVERSIA, 2012); es decir, la vinaza generada en este proceso supera de una a tres veces la producción del mismo bioetanol. Esto representa una dificultad para los ingenios azucareros, ya que la disposición final da origen a problemas de contaminación y salubridad (Páez, Muñoz, Candela, Tamoh, & Valdes-Abellan, 2016), como lo son la presencia de plagas y malos olores (Zúñiga & Gandini, 2013). Es por esto que, en los últimos años se han estudiado tecnologías alternativas, viables ambientalmente, para aprovechar las vinazas como fuente de compuestos orgánicos, tales como el ácido trans-aconítico, con potencial uso en la industria plastificante.

Una de las alternativas para aprovechar las vinazas como proveedor del ácido trans-aconítico es realizar la extracción líquido-líquido de dicho ácido, empleando como solvente el acetato de etilo (ACOET). Investigaciones previas han definido el método de cuantificación por cromatografía de alta eficiencia (HPLC) y han establecido las condiciones de extracción a escala laboratorio.

En la presente investigación se establecieron las condiciones de extracción del ácido trans-aconítico a escala semipiloto extrapolando las condiciones obtenidas a escala laboratorio por proyectos anteriores (pH, tiempo de extracción y temperatura), al estimar la relación másica óptima en términos de volumen de vinaza y solvente necesarias para dicha extracción, al cuantificar el ATA por HPLC y al realizar tres extracciones a escala semipiloto asegurando reproducibilidad de las mismas; luego de definir las condiciones al realizar lo descrito anteriormente, se elaboró un protocolo de extracción a escala semipiloto de ATA, contribuyendo así al aprovechamiento de las vinazas como fuente de este ácido.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

4.1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La industria azucarera del Valle del Cauca ha logrado pasar de productos básicos como el azúcar a la fabricación de etanol y la cogeneración de energía, gracias a su decidido impulso a la innovación. Para dicha consolidación, el sector azucarero cuenta en su balance con 13 ingenios, 1.200 cañicultores, dos empresas generadoras de energía, una productora de papel, una empresa sucroquímica, más de 40 empresas de alimentos, ocho de alcoholes y más de 50 proveedores especializados (ASOCAÑA, 2017).

Tiendo en cuenta los problemas que actualmente enfrenta el mundo en materia medioambiental, la producción de bioetanol, se ha convertido en una fuente de energía renovable y sostenible, además de ser estratégica para el país porque genera empleo formal, beneficia el medio ambiente, le permite reducir su dependencia y mantener las reservas de fuentes energéticas no renovables, como la gasolina u otros combustibles fósiles derivados del petróleo (García C. , 2008). Otra ventaja del bioetanol colombiano es que el proceso se realiza con caña de azúcar, y esta es más eficiente que otros cultivos en el almacenamiento de energía proveniente de la radiación solar. La caña de azúcar almacena esta energía en forma de biomasa, liberando 40 toneladas de oxígeno hacia la atmósfera y fijando 60 toneladas de dióxido de carbono (ASOCAÑA, 2017).

Si bien, a la producción de bioetanol se le atribuyen las ventajas mencionadas, durante dicho proceso productivo se genera un subproducto denominado vinaza, el cual es un potencial residuo contaminante para las aguas subterráneas si no es sometido al proceso adecuado para que sea utilizado como fertilizante y dicho proceso se lleva a cabo al concentrar la vinaza en su totalidad, al transformarla en compostaje y siendo distribuida en el campo (ASOCAÑA, 2017). Recientes investigaciones realizadas por integrantes del Grupo de Recursos Hídricos Dirección Técnica Ambiental, Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC Cali y CENICAÑA (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia) indican que durante los últimos años en el departamento del Valle del Cauca la vinaza ha sido arrojada de forma directa a los campos y esto ha generado que este residuo se convierta en un contaminante de los cuerpos acuíferos (Páez, Muñoz, Candela, Tamoh, & Valdes-Abellan, 2016), debido a que su alta carga orgánica provoca la proliferación de microorganismos que agotan el oxígeno disuelto en el agua ocasionando que los cuerpos de agua contaminados sean más difíciles de emplearlos como fuentes de agua potable (García & Rojas, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior y al resaltar que cada litro de etanol genera entre 1,00 y 14,00 L de vinaza, durante los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las líneas de investigación de brindar un uso alternativo a este subproducto; es por eso que, para abril del 2018, se establecieron las condiciones para la extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales, extrapolando las condiciones definidas a escala laboratorio por proyectos anteriores, obteniéndose un protocolo de extracción de dicho ácido a escala semipiloto reproducible industrialmente que garantiza el aprovechamiento de este residuo, al tener en cuenta que los desechos generados durante la esta extracción pueden ser utilizados como materia prima para la producción de biogas por el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Icesi.

4.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.2.1. INDUSTRIA AZUCARERA EN COLOMBIA

En Colombia, el sector azucarero se encuentra ubicado en el valle geográfico del río Cauca, abarca 47 municipios desde el norte del departamento del Cauca, la franja central del Valle del Cauca, hasta el sur del departamento de Risaralda, tal como se observa en la Figura 1.



Figura 1. Ubicación geográfica del sector azucarero en Colombia. (ASOCAÑA, 2017)

Esta distribución se debe, según lo afirma el Centro de Investigación de la Caña (CENICAÑA), al clima privilegiado de dicha región, dado que a diferencia del resto del mundo (con excepción de Hawaii y el norte de Perú), se puede sembrar y cosechar caña durante todos los meses del año. Según los indicadores presentados por ASOCAÑA, en esta región hay 225.560 hectáreas sembradas de caña azúcar (Figura 2), de las cuales, el 25,00% corresponde a tierras propias de los ingenios y el 75,00% restante a más de 2.750 cultivadores de caña (ASOCAÑA, 2017). Dichos cultivadores abastecen a 13 ingenios de la región (Carmelita, Riopaila-Castilla, Central Sicarare, Central Tumaco, Incauca, La Cabaña, Manuelita, María Luisa, Mayagüez, Pichichí, Providencia, Risaralda y Sancarlos) (Perafán, 2009).



Figura 2. Distribución de las áreas sembradas de caña de azúcar según la propiedad de los terrenos. (ASOCAÑA, 2017)

4.2.2. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Desde hace más de 10 años, el Sector Azucarero Colombiano se ha convertido en fuente de energía, no solo a través de la producción de azúcar, sino también de bioetanol y la cogeneración eléctrica. Según los registros obtenidos por ASOCAÑA, cinco de los trece ingenios mencionados anteriormente, tienen destilerías anexas para la producción de alcohol carburante (Incauca, Manuelita, Providencia, Mayagüez y Risaralda). (ASOCAÑA, 2017)

El bioetanol, es generado a partir de la energía almacenada en forma de biomasa de las mieles finales (mieles B) obtenidas después de la producción de azúcar, es decir después de los procesos de cristalización y centrifugación (CENICAÑA, 2004); estas mieles son utilizadas por los ingenios teniendo en cuenta que son provenientes de la caña de azúcar y este es cultivo exclusivamente tropical que crece durante todo el año, tal como se mencionó anteriormente, por lo tanto, la incidencia de la radiación solar oscila alrededor de 1,500,000 Kcal anuales por cada metro cuadrado sobre el campo de dicho cultivo, de esta energía la caña de azúcar fija, al realizar fotosíntesis de tipo C4, alrededor de 13,160 Kcal en cada metro cuadrado de cultivo y tras el proceso industrial, en el etanol producido por cada metro cuadrado del cultivo se recuperan 3,116 kcal, es decir el 0,21 % de la energía solar incidente. (García C. , 2008)

Todo lo anterior hace que el proceso de obtención de bioetanol a partir de la caña de azúcar sea más eficiente en comparación con otros cultivos (maíz, celulosa de madera, sorgo, patatas, trigo); un maizal que a diferencia de la caña se localiza a latitudes elevadas y por tanto recibe menos insolación, fija 8,500 Kcal en cada metro cuadrado (García C. , 2008) a lo largo de todo el periodo de crecimiento.

Emplear bioetanol como combustible en lugar de combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) confiere la ventaja reducir las emisiones de gases de efecto

invernadero (ej. CO₂), puesto que por cada kg de petróleo quemado se emiten 7,10 kg de CO₂, mientras que por cada kg de alcohol quemado se emiten 0,90 kg de CO₂ (Singer, 1981), además, al ser un compuesto biodegradable el 85,00% se degrada en aproximadamente 28 días, mientras que los combustibles fósiles pueden durar años para degradarse.

4.2.2.1. RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

El proceso productivo del bioetanol (Figura 3), como se mencionó, contempla como primer paso la producción de azúcar; la fracción que se exprime para extraer el azúcar de la caña contiene 44,00% de sacarosa y 7,00 % de otros azúcares, la fracción restante, está formada por fibras: celulosa, hemicelulosa y lignina (Aguirre, y otros, 2010). La sacarosa resultante se emplea como fuente de glucosa en las primeras etapas de fermentación alcohólica que llevan a cabo las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), siendo este proceso la base de la producción de bioetanol; la ganancia neta de la fermentación de una molécula de glucosa son 2 moléculas de etanol y 2 moléculas de ATP (Adenosín Trifosfato). En general, el proceso de fermentación alcohólica se lleva a cabo por dos etapas, en la primera etapa, se obtienen 2 moléculas de piruvato, 2 moléculas de ATP y 2 de NADH a partir de 1 molécula de glucosa por medio del proceso de glucolisis. En la segunda etapa, intervienen dos procesos enzimáticos por medio de los cuales, en primer lugar, a través de la acción de la enzima piruvato descarboxilasa se obtienen una molécula de acetaldehído y una molécula de CO₂ (Dióxido de carbono) por cada molécula de piruvato; y, en segundo lugar, por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa se obtiene una molécula de etanol, este paso requiere que el NADH obtenido durante el proceso de glucolisis de la primera etapa sea convertido en NAD⁺. De esta forma, la ganancia neta de la fermentación de una molécula de glucosa son 2 moléculas de etanol y 2 moléculas de ATP, tal como se mencionó.

Una vez terminado el proceso de fermentación, se procede a realizar la separación del alcohol del agua, por medio del proceso de destilación, en el cual el etanol al ser una sustancia volátil, punto de ebullición 78,37 °C, (Carretero, 2006) se separa del agua (punto de ebullición 100,00°C) al alcanzar la temperatura de su punto de ebullición, mediante evaporación y posterior condensación. Al finalizar este proceso se obtiene, el alcohol destilado, el cual puede estar en su forma de alcohol hidratado debido al agua, y requiere ser sometido al proceso de deshidratación; por otra parte, se obtienen, aguas residuales, las cuales son llevadas a tratamiento para su posterior uso y las vinazas como subproducto líquido de la destilación del etanol proveniente de la fermentación.

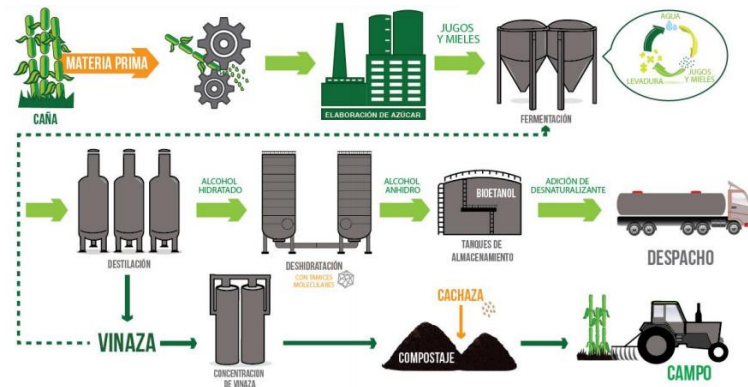


Figura 3. proceso de producción de Bioetanol. (ASOCAÑA, 2017)

4.2.3. VINAZA

Como bien se ha dicho, las vinazas son los residuos que se obtienen después del proceso de destilación de azúcares fermentados de la caña de azúcar; está compuesta por materiales orgánicos y nutrientes minerales que hacen parte de compuestos y constituyentes vegetales, dado que su origen es la planta de caña, tales como: aminoácidos, proteínas, lípidos, ácidos diversos, enzimas, bases, ácidos nucleicos, clorofila, lignina, quinonas, ceras y azúcares (García & Rojas, 2005), además de los componentes elementales arrastrados por el vapor de agua, así como cantidades de azúcar residual y componentes volátiles, sustancias inorgánicas solubles en las cuales predominan los iones K, Ca y SO₄, células muertas de levadura, sustancias orgánicas resultantes de los procesos metabólicos de levaduras y microorganismos contaminantes, alcohol y azúcar residual, sustancias orgánicas insolubles y sustancias orgánicas volátiles.

Con respecto a las sustancias orgánicas presentes se encuentran una amplia gama de compuestos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos y azúcares (Figura 4).

| Compuestos | Concentración |
|----------------------------------|---------------|
| No volátiles: | (%, m/m) |
| Glicerol | 2.70 |
| Ácido aconítico | 1.76 |
| Sorbitol | 1.39 |
| Fructosa + glucosa | 1.30 |
| Ácido láctico | 1.28 |
| Ácido cítrico | 0.80 |
| Ácido 2,4 dihidroxipentanedioico | 0.71 |
| Ácido quínico | 0.71 |
| Trehalosa | 0.31 |
| Ácido málico | 0.23 |
| Sucrosa | 0.21 |
| 2,3 Butanodiol | 0.21 |
| Ácido succínico | 0.07 |
| Ácido glicólico | 0.06 |
| Fenólicos: | (mg/kg) |
| Ácido Piroglutámico | 165 |
| Ácido Itacónico | 93 |
| Ácido Fumárico | 93 |
| 3-metoxi-4-hidroxifenilglicerol | 54 |
| Ácido p-hidroxibenzoico | 48 |
| Ácido Palmítico | 34 |

Figura 4. Compuestos orgánicos presentes en la vinaza. (García y Rojas, 2005)

4.2.4. ÁCIDO ACONÍTICO

Entre los componentes orgánicos de mayor concentración presentes en la vinaza (Figura 4), se encuentra el ácido aconítico, un ácido alifático insaturado tribásico, de fórmula molecular $C_6H_6O_6$ que presenta dos isómeros geométricos cuyas estructuras moleculares se muestra en la Figura 5, ambos se producen naturalmente en las plantas de caña de azúcar en proporciones variables mediante el ciclo de Krebs.

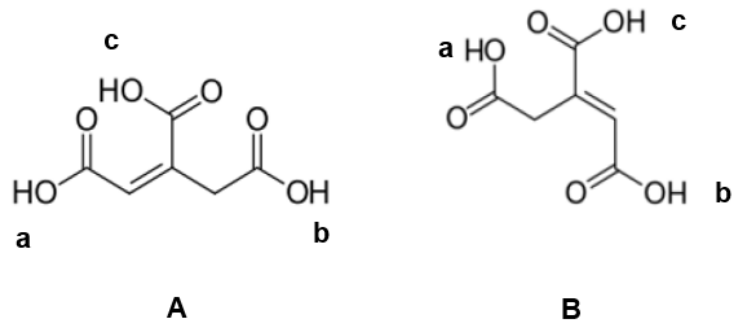


Figura 5. (A) Estructura del ácido cis-aconítico, (B) Estructura del ácido trans-aconítico; (a, b y c), representan los hidrógenos ionizables de cada uno. Los pKa respectivamente son: 2,8 (a), 4,6 (b) y 6,3 (c). (Gil, 2007)

4.2.4.1. ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO

El isómero trans es el más estable de los dos, puesto que, en condiciones adecuadas de temperatura y pH, el isómero cis forma una mezcla en equilibrio en la que predomina el isómero trans (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2013). Esta propiedad le permite al ácido trans-aconítico (ATA) ser un candidato adecuado para la formación de polímeros amorfos, ramificados e insolubles en agua, tras una reacción de condensación con 1,6 diaminohexano (Vásquez, 2014) y, por lo tanto, se utiliza cada vez más en la industria de procesamiento de alimentos como un acidulante o intermediario reactivo en la síntesis orgánica de plastificantes y tensoactivos (Malmayr, y otros, 1995).

4.2.4.1.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

Para realizar la extracción del ATA a partir de las vinazas residuales se han empleado varios métodos entre los más frecuentemente empleados están: precipitación, extracción por intercambio iónico y extracción líquido-líquido, siendo este último el más empleado a escala laboratorio y semipiloto (planta de extracción). Esta técnica de separación se basa en la distribución de los componentes a separar entre las fases líquidas involucradas, es decir, el componente a extraer se transfiere de la primera fase a la segunda. Estudios demuestran que al realizar la extracción líquido-líquido de ATA utilizando acetato de etilo a diferentes tiempos y temperaturas, se obtiene un rendimiento de 34,00 – 69,00% y una pureza de 99,90% de ATA (Gil, 2007), y ello se ilustra en la Figura 6.

| Table 1. Yield and purity of aconitic acid extracted from molasses | | | | | | |
|--|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Time | Temperature | | | | | |
| | 30°C | | | 40°C | | |
| | 1h | 3h | 6h | 1h | 3h | 6h |
| Yields | 34.4 ± 1.8 | 43.4 ± 0.7 | 49.9 ± 0.6 | 43.3 ± 0.5 | 63.0 ± 1.8 | 68.8 ± 0.5 |
| Purity | 99.9 ± 0.2 | 99.6 ± 0.7 | 99.5 ± 0.4 | 99.7 ± 0.2 | 99.9 ± 0.8 | 99.6 ± 0.2 |

Figura 6. Tabla comparativa del rendimiento y pureza obtenida para la extracción de ATA con acetato de etilo a diferentes tiempos y temperaturas. (Gil, 2007)

De igual forma, con el fin de determinar la eficiencia y selectividad del acetato de etilo (ACOET) como solvente de extracción de ATA, éste se comparó con dos solventes más: el butanol y tributil fosfato, y se encontró que con el butanol se obtuvo una mayor cantidad de ATA pero con poca selectividad, a diferencia del acetato de etilo en el cual su rendimiento no fue tan bueno pero tuvo la mejor selectividad de los tres solventes utilizados (Zapata, 2007); dichas comparaciones se muestran las Figuras 7 y 8. Esto comprueba una vez más que el acetato de etilo es un solvente adecuado para realizar la extracción líquido-líquido del ATA.

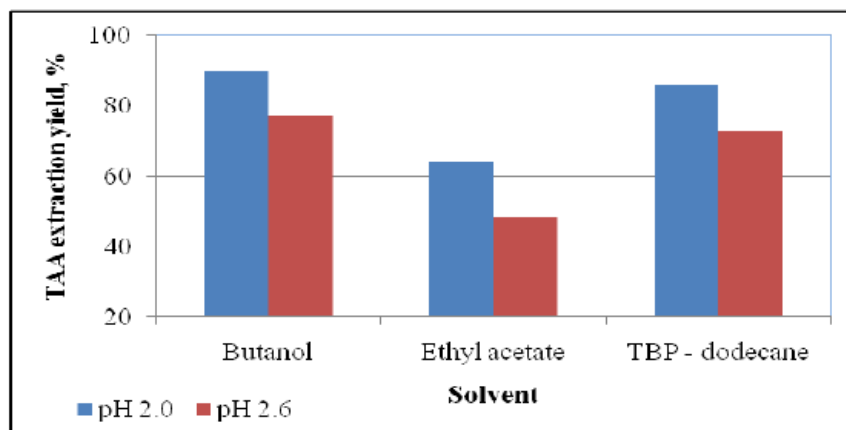


Figura 7. Rendimiento de extracción del ácido trans-aconítico con diferentes solventes y condiciones de pH. (Zapata, 2007)

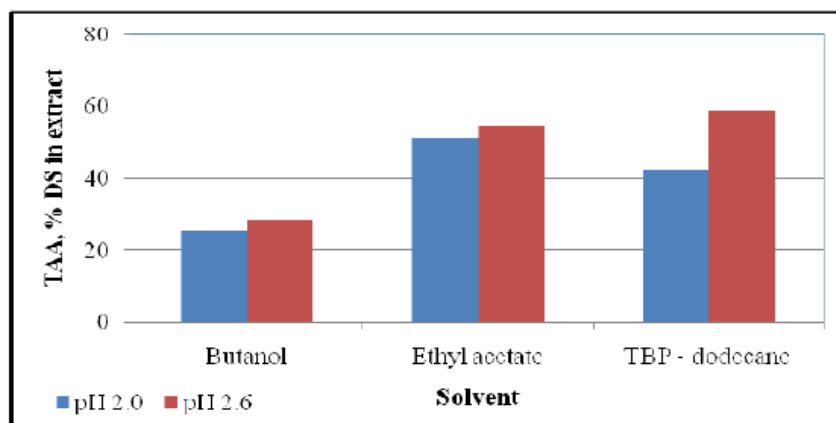


Figura 8. Comparación de la pureza del ácido trans-aconítico en diferentes solventes y condiciones de pH. (Zapata, 2007)

Cabe resaltar que, para realizar una extracción de este tipo, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros: la capacidad de ionización del compuesto a extraer, que depende del pH en el cual se encuentre la muestra que contiene el compuesto de interés, la temperatura y la relación de la cantidad de compuesto en cada una de las fases, lo cual depende de solvente empleado. En el proceso de extracción líquido- líquido se denomina matriz a la solución que contiene el componente a separar, vinaza (A); el componente transferido (ATA) se indica con (C), y el líquido utilizado para extraer el componente C de la matriz, se denomina fase orgánica B (ACOET), tal como se muestra en la Figura 9. Dos etapas adicionales de dicha extracción son: la recuperación de disolventes y la limpieza del refinado (Muller, 2002).

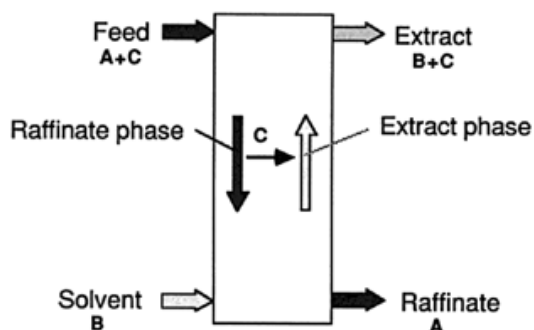


Figura 9. Representación de la extracción líquido-líquido. (Muller, 2002)

4.2.4.1.1.1. EXTRACCIÓN A ESCALA SEMIPILOTO

Es importante destacar que la extracción a escala semipiloto del ATA a partir de vinazas residuales se realizó por primera vez por medio de este proyecto

investigativo y para tal fin, se extrapolaron las cuatro condiciones o parámetros de extracción de ATA a escala laboratorio a partir de vinazas residuales obtenidas por Jeyson Ruiz en su proyecto de grado “Establecimiento de condiciones de extracción de ácido trans-aconítico a partir de vinazas residuales mediante cromatografía líquida”; y estas son:

1. pH= 2,0 de la muestra de vinaza
2. Tiempo de extracción con agitación constante de 3,0 horas
3. Temperatura ambiente 20°C – 25 °C
4. Relación 1:2 (muestra: ACOET)

Con las cuales se obtiene dos fases denominadas Fase Orgánica y Fase Acuosa; siendo la primera la fase que contiene en mayor proporción el ATA, compuesto de interés.

4.2.4.1.2. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN

Para análisis y cuantificación de ATA extraído a partir de vinazas residuales se ha empleado la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos, la cual se fundamenta en las interacciones o afinidad que tiene el analito con la fase móvil o con la fase estacionaria; de esta forma, teniendo en cuenta la afinidad del analito se elige el tipo de columna, y la fase móvil se elige de acuerdo con el solvente. Según esto, se debe tener en cuenta que el ATA no presenta una buena retención en columnas cromatográficas hidrofóbicas y, por tanto, se ha buscado emplear columnas de fase reversa con grupos polares incrustados en ella para aumentar las interacciones hidrofílicas (Montoya, Londoño, Cortés, & Izquierdo, 2014).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones para la extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA) a partir del subproducto vinaza obtenido de la producción de bioetanol.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 5.2.1. Determinar el procedimiento de extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA).

- 5.2.2. Cuantificar por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) el contenido extraído del ácido trans-aconítico (ATA).
- 5.2.3. Asegurar la reproducibilidad del procedimiento de extracción del ácido trans-aconítico (ATA) empleando la planta semipiloto.

6. METODOLOGÍA

6.1. REACTIVOS EMPLEADOS

Tabla 1. Nombre, casa comercial y pureza de los reactivos empleados para el desarrollo del trabajo de investigación.

| Reactivo | Casa Comercial | Pureza |
|------------------|--------------------|--------|
| Acetato de Etilo | Agenquimicos LTDA. | 99.8% |
| Ácido Sulfúrico | MERCK | 95-97% |

6.2. MATERIALES Y EQUIPOS

- Material de vidrio
- Balanzas analíticas con precisión de 1×10^{-4} g con agitación magnética graduada
- Planchas de calentamiento y agitación
- Báscula de aproximadamente 300 Kg
- Equipo rotaevaporador
- Montaje de destilación para la recuperación del solvente acetato de etilo (ACOET)
- Planta semipiloto de extracción de la Universidad Icesi
- Equipo de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos

6.3. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de vinaza utilizada se obtuvo mediante el convenio realizado con el Ingenio Manuelita, con el cual se adquirió 50,00 L de Vinaza Concentrada 40° Brix. Dicha muestra fue acidificada siguiendo como referencia las condiciones de extracción de ATA establecidas a escala de laboratorio por Jeyson Ruiz en su proyecto de grado “Establecimiento de condiciones de extracción de ácido trans-aconítico a partir de vinazas residuales mediante cromatografía líquida”. (Ruiz,

2016). En los cuales se establece que la muestra debe tener un pH de 2,0 para que la extracción de ATA sea óptima.



Figura 10. Proceso de recolección de la muestra de vinaza proveniente del Ingenio Manuelita.

6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA DETERMINAR LA RELACIÓN MÁSCICA (VINAZA: ACOET)

Para determinar la relación másica, es decir la cantidad en volumen de vinaza y de solvente Acetato de Etilo (ACOET) necesaria y óptima para realizar la extracción de ATA a escala semipiloto, se realizaron cuatro experimentos a escala laboratorio variando la cantidad en volumen de los componentes mencionados; este diseño fue efectuado debido a que al reproducir a escala semipiloto la cuarta condición de extracción de ATA obtenida a escala laboratorio por Jeyson Ruiz en su proyecto de grado (Relación 1:2 (muestra vinaza: ACOET)) tal como se menciona en la teoría, no se obtuvieron las dos fases es decir, es decir no hubo extracción. De igual forma, cabe resaltar que adicionalmente se realizaron extracciones a escala semipiloto con relaciones de 1:3, 1:4 y 1:5 muestra vinaza: ACOET, respectivamente; mediante las dos primeras relaciones no se consiguió la separación de las fases, mientras que con la tercera relación si se logró dicha separación. Así que, con el fin de corroborar este hallazgo y encontrar la relación por medio de la cual se obtuviera mayor contenido de ATA, al realizar comparaciones, fueron efectuados cuatro experimentos como se describen a continuación:

6.4.1. Experimento 1: Relación 1:2 (muestra vinaza: ACOET)

Tomando 10 mL de Vinaza y 20 mL de ACOET
Realizado por triplicado

6.4.2. Experimento 2: Relación 1: 5 (muestra vinaza: ACOET)

Tomando 5 mL de Vinaza y 25 mL de ACOET
Realizado por triplicado

6.4.3. Experimento 3: Relación 1:10 (muestra vinaza: ACOET)

Tomando 1 mL de Vinaza y 10 mL de ACOET
Realizado por triplicado

6.4.4. Experimento 4: Relación 1:20 (muestra vinaza: ACOET)

Tomando 1 mL de Vinaza y 20 mL de ACOET
Realizado por triplicado

Este procedimiento se realizó manteniendo constantes las tres condiciones de extracción de ATA siguientes obtenidas por Jeyson Ruiz a escala laboratorio en su proyecto de grado.

1. pH= 2,0 (tal como se mencionó en el ítem anterior)
2. Tiempo de extracción con agitación constante de 3,0 horas
3. Temperatura ambiente 20°C – 25 °C

Para dicho fin, se emplearon tres planchas de calentamiento y agitación para las tres repeticiones por experimento realizado (Figura 11), manteniendo solamente en funcionamiento la agitación. Una vez terminado el tiempo de tres horas para cada experimento, se procedió a determinar por HPLC el contenido de ATA en cada una de las fases obtenidas y sus respectivas repeticiones, habiendo eliminado previamente el ACOET y secado dichas muestras; con el fin de definir la relación másica con mayor porcentaje en contenido de ATA. Cabe resaltar que, las preparaciones de cada una de las muestras llevadas al HPLC siguieron los lineamientos reportados en el ítem 6.6.1.



Figura 11. Montaje para el diseño experimental realizado para determinar la relación másica (vinaza: acetato de etilo) óptima.

Obtenida la relación másica óptima se prosiguió a realizar la extracción de ATA a escala semipiloto, tal como se detalla a continuación.

6.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO EN PLANTA SEMIPILOTO

Para realizar la extracción de ATA a escala semipiloto, se empleó la planta de extracción semipiloto disponible en la Universidad Icesi, construida por Process Solutions and Equipment (PSE), en el año 2016. El esquema general de la planta se puede observar en la Figura 7, en la cual se distinguen los siguientes componentes principales:

1. Percolador: tanque cónico truncado de acero inoxidable en el cual se introduce la muestra y el solvente, el cual tiene una capacidad total de 20,0 L y se debe llenar en un 80,00%. (Process solutions and equipment PSE S.A.S, 2016)
2. Concentrador: intercambiador de coraza y tubos, con arreglos tipo TEMA, empleado para introducir la muestra recolectada con solvente, el cual posteriormente será recuperado.
3. Tanques colectores de solvente: tanques cilíndricos simétricos de acero inoxidable utilizado para almacenar el solvente que ha sido destilado y recuperado.

Cabe resaltar que, se empleó este equipo porque realiza la separación de componentes de interés (ATA) de una muestra sólida o líquida (Vinaza) basado en

las diferencias de solubilidad de la misma en determinado solvente (ACOET), siendo estos de volúmenes mayores de 1,00 L.

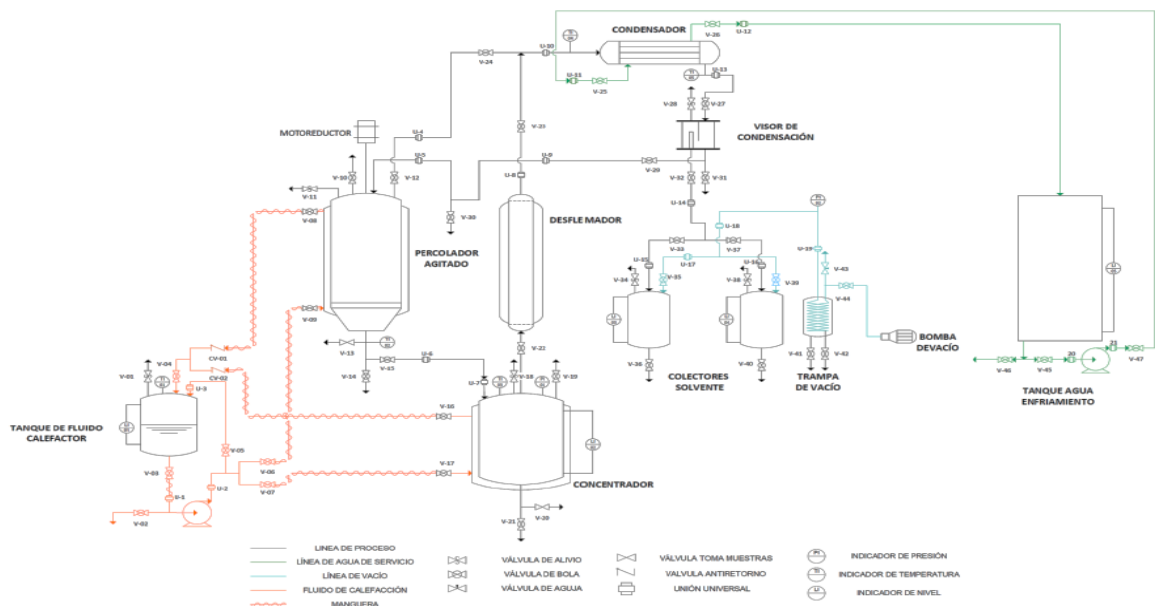


Figura 12. Esquema general de la planta semipiloto de la Universidad ICESI. (Cruz y Villegas, 2016)

Para asegurar la reproducibilidad de la extracción de ATA a escala semipiloto empleando la planta de extracción semipiloto de la Universidad Icesi, se realizaron tres extracciones, en las cuales se mantuvieron las condiciones anteriormente descritas: las tres establecidas por Jeyson Ruiz en su proyecto de grado y la cuarta, determinada por medio el diseño experimental realizado (la relación másica). Adicionalmente, las tres extracciones siguieron los parámetros establecidos en el Protocolo de extracción de ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto (Anexo 1), el cual fue obtenido después de realizar varios intentos y pruebas teniendo en cuenta las condiciones mencionadas.

Con lo anterior, para cada una de las tres extracciones se realizó lo siguiente:

6.5.1. CARGA DEL SISTEMA

La muestra de vinaza y el solvente (ACOET), medidos previamente para alcanzar la relación másica óptima determinada, fueron introducidos al tanque percolador junto con el aspa de agitación grande; este sistema fue puesto en funcionamiento hasta el término de tres horas, a temperatura ambiente.

6.5.2. RECOLECCIÓN DE LAS FASES

Una vez terminado el tiempo de extracción con agitación constante de tres horas se recolectaron las fases obtenidas: Fase Acuosa F.A y Fase Orgánica F.O, las cuales fueron medidas. La F.A fue enviada al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad ICESI, como precursor de la digestión anaeróbica, y la F.O obtenida recibió el tratamiento descrito a continuación.

6.5.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

6.5.3.1. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA Y RECOLECCIÓN DEL SOLVENTE

Una vez recolectada la F.O, se procedió a concentrarla: definido como el proceso por medio del cual se eliminó el solvente (ACOET) de la misma, dejándola parcialmente seca. Este proceso se realizó introduciendo la cantidad de F.O medida al tanque concentrador de la planta semipiloto. Terminado el proceso de concentración de la muestra, se procedió a recolectar y medir la cantidad de muestra de F.O concentrada y del solvente ACOET recuperado.

6.5.3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE LA FASE ORGÁNICA CONCENTRADA

La F.O concentrada obtenida se llevó al equipo rotaevaporador, con el fin de eliminar residuos de ACOET y agua, hasta asegurar que la muestra estuviera totalmente seca. La muestra seca obtenida fue llamada biomasa de ATA, siendo ésta la cantidad de Ácido Trans-aconítico (ATA) obtenida al final de todo el proceso de extracción y tratamiento de la muestra, y para la cual se requiere un proceso adicional de purificación para el ATA empleando la técnica de cromatografía de intercambio iónico realizado por Juan David Giraldo asistente del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Icesi, teniendo en cuenta la presencia de otros ácidos orgánicos.

6.6. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO POR HPLC

Para esta etapa se seguirán los pasos establecidos en el proyecto desarrollado por la estudiante Sandra Orozco, denominado "Validación del método cromatográfico HPLC-DAD para la determinación de Ácido trans-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar". Por medio del cual, se planteó la validación de

un método analítico de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA) y la elaboración del procedimiento analítico estándar (POE) de dicho método; contribuyendo así al desarrollo de nuevas investigaciones en torno a los métodos de extracción del ATA, tal como el presente proyecto investigativo.

El método cromatográfico HPLC-PDA de cuantificación de ATA que se validó, en el proyecto mencionado, consistió en la preparación de una curva de calibración de estándar de dicho ácido en Agua tipo I entre 20 y 200 ppm, dicha preparación se realizó de la siguiente manera:

Solución Stock:

1. Se llevó un peso de 10,00 mg de estándar de ATA en un balón volumétrico de 20,00 mL
2. Adicionando 10,00 mL de agua Tipo I y agitando manualmente por 5 minutos
3. Se completó el volumen con agua Tipo I, se tapó y agitó manualmente por un minuto
4. Por último, se rotuló el balón como Solución Stock

Estándares de la Curva de Calibración:

1. En 5 balones volumétricos de 10,00 mL, se adicionaron alícuotas de 0,4, 1,2, 2, 3 y 4,0 mL de la Solución Stock a cada balón
2. Se completó el volumen de cada uno de los balones con agua Tipo I y se agitó manualmente por 5 minutos
3. Se rotuló cada solución estándar como 20, 60, 100, 150 y 200 ppm, respectivamente
4. Se tomó 1 mL de cada solución estándar
5. Se filtró por membrana de 0,22 μm y se llevó a un vial de inyección cada una de las soluciones estándar
6. El procedimiento de los pasos (4) y (5) se repitieron, hasta tener tres viales de inyección por cada solución estándar

Y, las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes (Ruiz, 2016):

1. Equipo HPLC con detector PDA. (Chrom Elite Merck)
2. Columna: XBridge 2,5 μm 75 mm x 4,6 mm
3. Flujo: 0,6 mL/min
4. Temperatura: 25°C
5. Fase móvil: Agua pH 2,5 (Con HCl): Acetonitrilo (95:5)
6. Longitud de onda: 240 nm.
7. Volumen de inyección: 10 μL
8. Tiempo de retención aproximado: 2,7 minutos

6.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA HPLC

El fin de cuantificar por HPLC el contenido de ATA de las muestras obtenidas en este proyecto investigativo es realizar comparaciones de la cantidad obtenida de ATA, de muestras iniciales de vinaza y muestras obtenidas a partir de la extracción de dicho compuesto, y con esto realizar un seguimiento de la extracción, es decir, por medio de los cromatogramas obtenidos identificar si cada vez que se realizan procedimientos para efectuar la extracción de ATA a escala semipiloto en efecto se obtiene una mejor extracción de este compuesto. Todas las muestras llevadas a HPLC para realizar la cuantificación del contenido de ATA, fueron en primer lugar llevadas a sequedad, eliminando el solvente ACOET y agua remanente, y, en segundo lugar, se llevó a cabo el procedimiento establecido por Jeyson Ruiz en su proyecto de grado “Establecimiento de condiciones de extracción de ácido trans-aconítico a partir de vinazas residuales mediante cromatografía líquida”.

1. Se pesaron 50,00 mg de muestra seca en un beaker
2. La muestra del paso (1) fue llevada a un balón de 10,00 mL hasta aforo, empleando agitación manual para asegurar disolución

Con lo cual se llegó a una concentración de 5 mg/mL lo que es igual a 5000 mg/L, y a su vez es igual a 5000 ppm. (ecuación 1)

$$\frac{50 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{L} = 5000 \frac{\text{mg}}{L} = 5000 \text{ ppm} \quad (1)$$

3. Se tomó 1,00 mL de muestra
4. Se filtró por membrana de 0,22 μm , llevando dicho contenido a un vial de inyección

6.7. MATRIZ DE MARCO LÓGICO

| OBJETIVOS | ACTIVIDADES | SUPUESTOS | INDICADORES |
|---|--|---|---|
| Determinar el procedimiento de extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA) | Capacitación para el manejo de la planta semipiloto Revisión de las condiciones de extracción del | Disponibilidad de la planta semipiloto de la Universidad ICESI Disponibilidad de reactivos: solvente | Relación del volumen requerido de solvente de extracción Acetato de Etilo (ACOET) y de subproducto vinaza obtenido. |

| | | | |
|---|---|--|--|
| | <p>ácido trans- aconítico ATA a partir de vinazas residuales, determinadas a escala laboratorio por otros proyectos de grado</p> <p>Determinación de la cantidad de vinaza y solvente Acetato de Etilo (ACOET) a utilizar para la extracción</p> | <p>Acetato de Etilo (ACOET)</p> <p>Disponibilidad de la muestra de vinaza del Ingenio Manuelita</p> | <p>Control de pH, tiempo de extracción y temperatura realizado.</p> <p>Establecimiento del protocolo de extracción de ATA a escala semipiloto realizado.</p> |
| <p>Cuantificar por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) el contenido extraído del ácido trans-aconítico (ATA).</p> | <p>Capacitación para el manejo del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)</p> <p>Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) del ácido trans- aconítico (ATA) extraído mediante planta semipiloto</p> <p>Revisión de los resultados obtenidos por</p> | <p>Disponibilidad del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)</p> <p>Extracción de ATA a escala semipiloto realizada</p> | <p>Cuantificación por HPLC de cantidad de ATA realizada</p> <p>Identificación y comparación de la cantidad de ATA con su estándar realizada</p> |

| | | | |
|---|---|---|--|
| | <p>Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) del ácido trans-aconítico (ATA) extraído a escala laboratorio por otros proyectos de grado</p> | | |
| <p>Asegurar la reproducibilidad del procedimiento de extracción del ácido trans-aconítico (ATA) empleando la planta semipiloto.</p> | <p>Realización dos extracciones del ácido trans-aconítico (ATA) empleando la planta semipiloto, replicando las condiciones determinadas a escala laboratorio por otros proyectos de grado y empleando la relación de volúmenes de la muestras y solvente de extracción encontrada</p> | <p>Disponibilidad de la planta semipiloto de la Universidad ICESI</p> <p>Disponibilidad del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)</p> | <p>Mínimo dos extracciones de ATA controlando las condiciones de pH, temperatura y la relación de volúmenes realizadas.</p> <p>Verificación por HPLC de la cantidad de ATA de las diferentes extracciones realizada.</p> |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | <p>mediante este proyecto</p> <p>Comparación mediante la cuantificación por HPLC la cantidad obtenida de ATA determinando así, el rendimiento de las extracciones realizadas</p> | | |
|--|--|--|--|

7. RESULTADOS

A continuación, se presentan los detalles experimentales realizados para en primer lugar, establecer el procedimiento de extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA), en términos de la relación del volumen requerido de solvente de extracción Acetato de Etilo (ACOET) y del subproducto vinaza, manteniendo constantes las condiciones ya establecidas para dicha extracción; en segundo lugar, al realizar la cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) el contenido extraído del ATA; y en tercer lugar, para asegurar la reproducibilidad del procedimiento de extracción del mencionado ácido empleando la planta semipiloto.

7.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez recolectada la muestra de 50,00 L de vinaza proveniente del Ingenio Manuelita, se realizó la medición del pH de llegada el cual fue de 4,42 y se procedió a realizar la cuantificación por HPLC de ATA siguiendo los parámetros contenidos en el ítem 6.6.1. para la preparación de la muestra para HPLC, con el fin de identificar la presencia de ATA a este pH. En la Figura 13, se muestra el cromatograma arrojado, por medio del cual se evidencia la concentración de ATA reportada en ppm de 139,60 ppm.

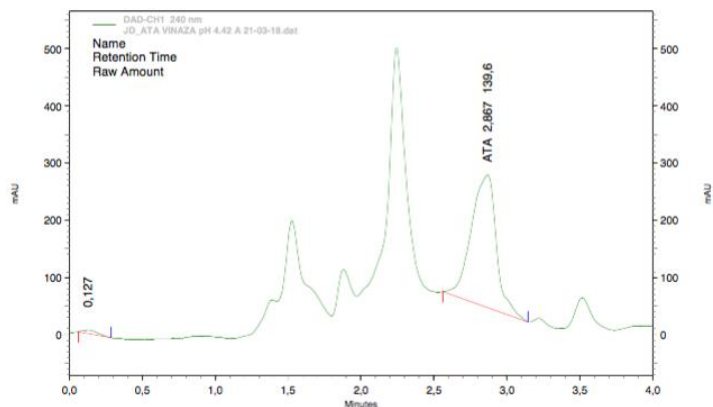


Figura 13. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra proveniente del Ingenio Manuelita con un pH de 4,42.

Es decir, el porcentaje de ATA en esta muestra inicial de llegada es de 2,79%. Teniendo en cuenta que la concentración de la muestra es de 5000 ppm (ítem 6.6.1.) y que la concentración de ATA en esta muestra fue de 139,60 ppm, se aplicó la siguiente relación (ecuación 2) para determinar el porcentaje (ecuación 2.1 muestra del cálculo).

$$\text{Cantidad ppm de ATA} \times \frac{100 \%}{5000 \text{ ppm de muestra}} = \% \text{ de ATA} \quad (2)$$

$$139,60 \text{ ppm} \times \frac{100 \%}{5000 \text{ ppm}} = 2,79\% \quad (2.1)$$

Adicionalmente, siguiendo los lineamientos del ítem 6.3 de recolección y preparación de la muestra, la anterior muestra, fue llevada a pH 2,08 y se cuantificó la cantidad de ATA presenté: 657,30 ppm (Figura 14). Empleando la ecuación 2 se determinó que esta muestra contiene 13,31% de ATA.

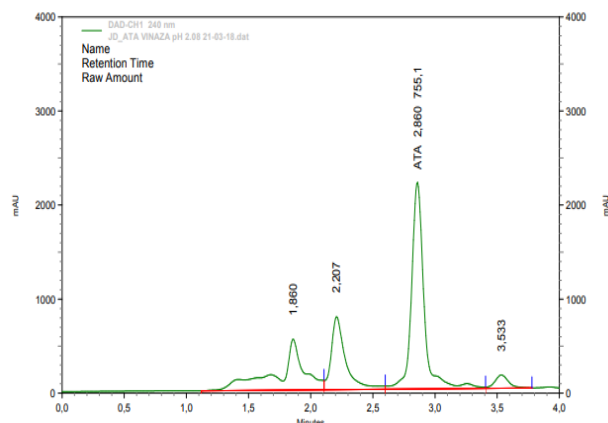


Figura 14. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra llevada a pH 2,08.

7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA DETERMINAR LA RELACIÓN MÁSCICA (VINAZA: SOLVENTE)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al realizar los cuatro experimentos mencionados en el ítem 6.4. Para los cuales se siguieron las tres condiciones descritas:


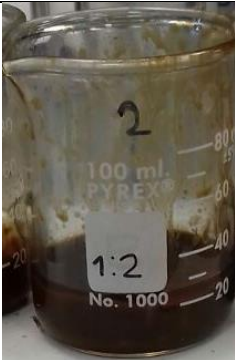
1. pH= 2,00
2. Tiempo de extracción con agitación constante de 3,0 horas
3. Temperatura ambiente 20°C – 25 °C

Cabe resaltar que, al finalizar el tiempo de extracción con agitación constante en todas las repeticiones de cada experimento realizado se presentaron dos fases, F.A y F.O. La primera, se caracterizó por presentar una consistencia viscosa y coloración marrón, y situarse en la parte inferior del beaker, mientras que la segunda, se caracterizó por presentar una consistencia poco viscosa y coloración naranja, además de situarse en la parte superior del beaker. Estos nombres fueron dados de acuerdo con la afinidad de cada fase, siendo la F.A afín al agua y, por lo tanto, contener componentes afines al agua y la F.O afín al solvente orgánico empleado (ACOET) y, por lo tanto, contener en mayor proporción el ATA (compuesto orgánico).

Para cada una de las repeticiones y su respectiva fase se preparó una muestra siguiendo los parámetros contenidos en el ítem 6.6.1., la cual fue al equipo HPLC para realizar la cuantificación de ATA.

7.2.1. EXPERIMENTO 1 (RELACIÓN 1:2)

Tabla 2. Resultados obtenidos al realizar el experimento 1 (relación 1:2 - Vinaza: ACOET)

| RELACIÓN 1:2 | | | | |
|----------------------|-----|---|--------------|--------------------------|
| Número de repetición | | Imagen | Cromatograma | Concentración ppm de ATA |
| Repetición 1 (1x) | F.O |  <p>Figura 15. Fases obtenidas al realizar el experimento 1 (relación 1:2) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 18 | 931,53 ppm |
| | F.A | | Figura 19 | 32,66 ppm |
| Repetición 2 (2x) | F.O |  <p>Figura 16. Fases obtenidas al realizar el experimento 1 (relación 1:2) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 20 | 964,81 ppm |
| | F.A | | Figura 21 | 36,79 ppm |

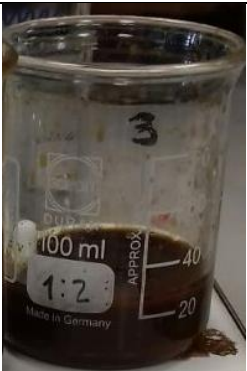
| | | | | |
|-------------------|-----|---|-----------|------------|
| | | superior F.O e inferior F.A. | | |
| Repetición 3 (3x) | F.O |  | Figura 22 | 544,16 ppm |
| | F.A | | Figura 23 | 43,39 ppm |

Figura 17. Fases obtenidas al realizar el experimento 1 (relación 1:2) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A.

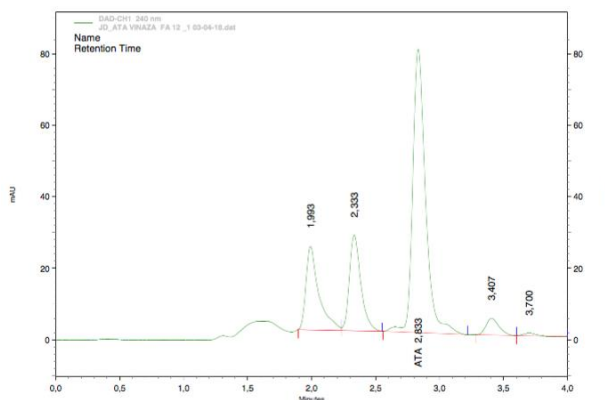


Figura 18. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 1, repetición 1.

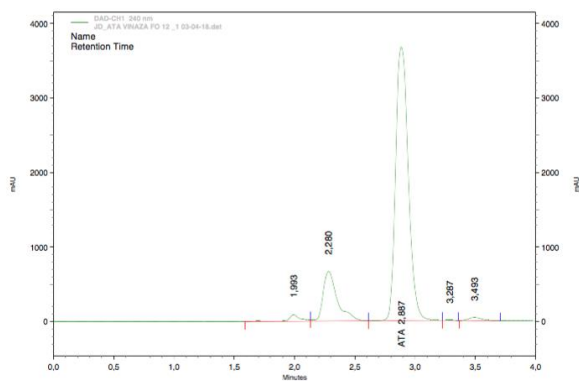


Figura 19. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 1, repetición 1.

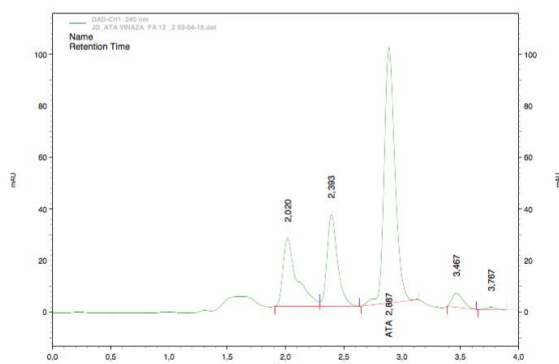


Figura 20. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 1, repetición 2.

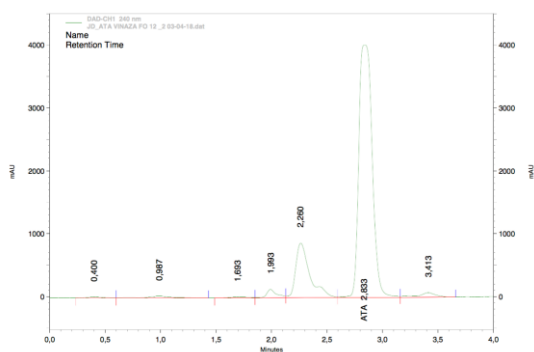


Figura 21. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 1, repetición 2.

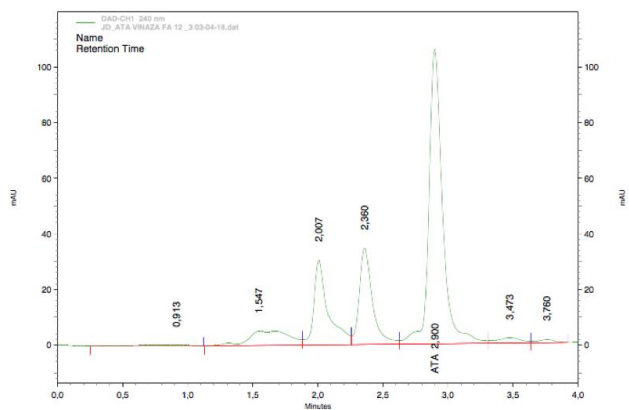


Figura 22. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 1, repetición 3.

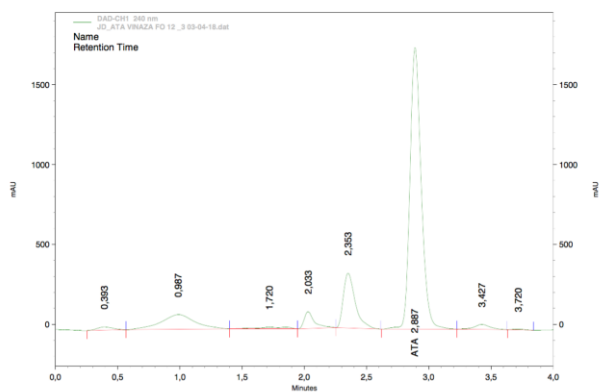


Figura 23. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 1, repetición 3.

Obtenidas las concentraciones en ppm de ATA de cada fase y su respectiva repetición, tal como se muestra en la Tabla 2, se procedió a calcular el porcentaje de ATA para cada fase y su respectiva repetición, empleando la ecuación 2; los promedios (\bar{x}) de los resultados del cálculo del porcentaje de ATA, se muestran en las Tablas 3 y 4, para las repeticiones de la F.A y F.O, respectivamente.

Adicionalmente, se procedió a calcular la Desviación Estándar Relativa (por sus siglas en inglés RSD) para la cantidad de ATA obtenida en porcentaje por cada repetición en cada fase, los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, para las fases F.A y F.O, respectivamente. El cálculo se efectuó empleando las siguientes ecuaciones: 3 y 4, teniendo en cuenta que por medio de la ecuación 3 se obtuvo la desviación estándar, necesaria para calcular el RSD mediante la ecuación 4, además que \bar{x} es el promedio de las concentraciones de ATA obtenidas en porcentaje, que x es el resultado de la concentración de ATA en % obtenida para cada repetición y que n es igual a tres, es decir al número de repeticiones.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4)$$

Tabla 3. Resultados en términos de porcentaje de ATA obtenido en el experimento 1 (relación 1:2) en la F.A.



| RELACIÓN 1:2 FASE ACUOSA | | | | |
|--------------------------|----------------------|-------|---------------|----------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 32,66 | 0,65 | 0,75 | 14,00 |
| 2 | 36,79 | 0,74 | | |
| 3 | 43,39 | 0,86 | | |

Tabla 4. Resultados en términos de porcentaje de ATA obtenido en el experimento 1 (relación 1:2) en la F.O.

| RELACIÓN 1:2 FASE ORGÁNICA | | | | |
|----------------------------|----------------------|-------|---------------|----------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 931,53 | 18,63 | 16,26 | 28,00 |
| 2 | 964,81 | 19,29 | | |
| 3 | 544,16 | 10,88 | | |

7.2.2. EXPERIMENTO 2 (RELACIÓN 1:5)

Tabla 5. Resultados obtenidos al realizar el experimento 2 (relación 1:5 - Vinaza: ACOET)

| RELACIÓN 1:5 | | | | |
|----------------------|-----|---|--------------|--------------------------|
| Número de repetición | | Imagen | Cromatograma | Concentración ppm de ATA |
| Repetición 1 (1x) | F.O |  <p>Figura 24. Fases obtenidas al realizar el experimento 2 (relación 1:5) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 27 | 1451,49 ppm |
| | F.A | | Figura 28 | 24,39 ppm |
| Repetición 2 (2x) | F.O |  <p>Figura 25. Fases obtenidas al realizar el experimento 2 (relación 1:5) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 29 | 1389,05 ppm |
| | F.A | | Figura 30 | 37,37 ppm |


| | | | | |
|-------------------|-----|---|-----------|-------------|
| Repetición 3 (3x) | F.O |  | Figura 31 | 44,30 ppm |
| | F.A | | Figura 32 | 1367,57 ppm |

Figura 26. Fases obtenidas al realizar el experimento 2 (relación 1:5) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A.

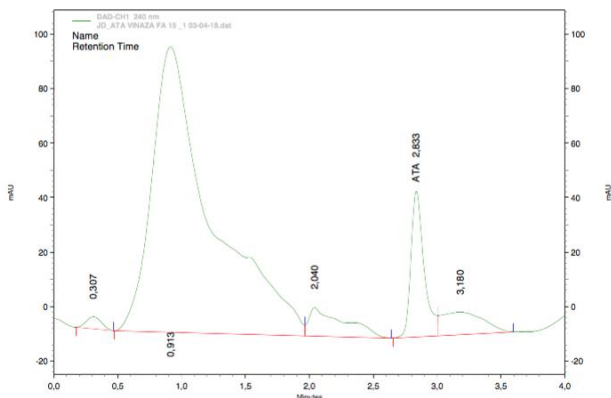


Figura 27. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 2, repetición 1.

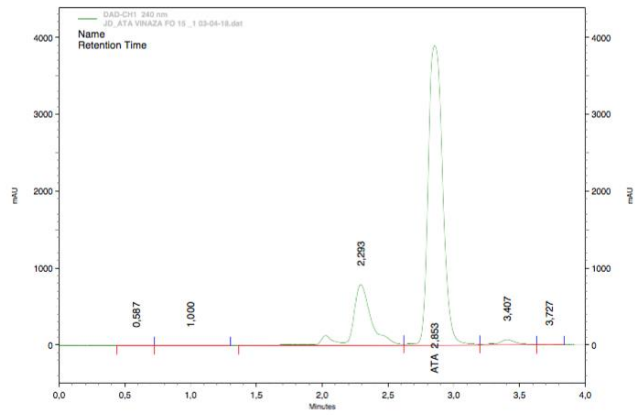


Figura 28. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 2, repetición 1.

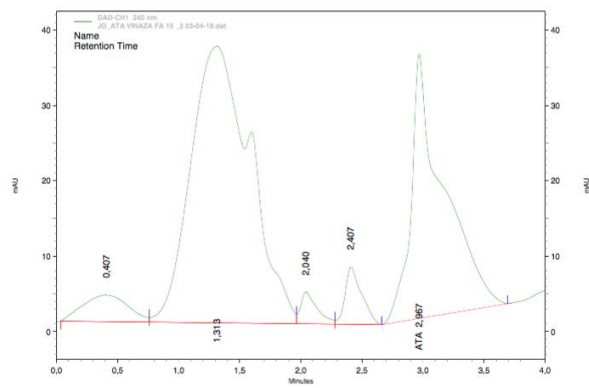


Figura 29. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 2, repetición 2.

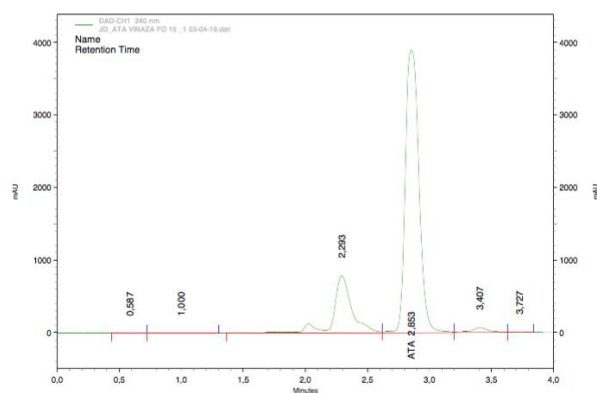


Figura 30. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 2, repetición 2.

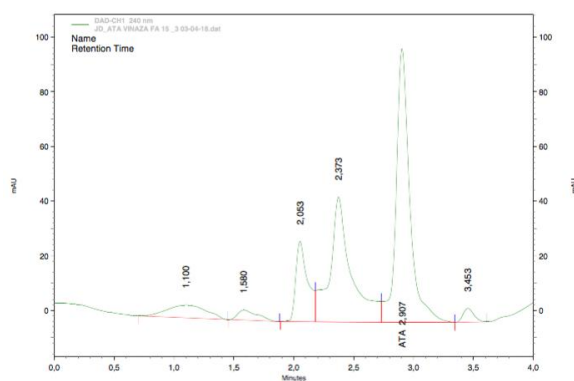


Figura 31. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 2, repetición 3.

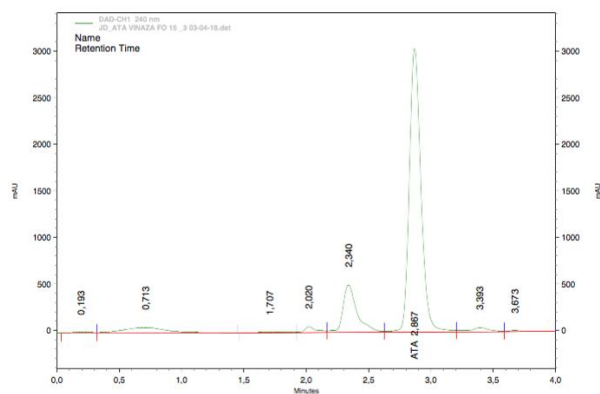


Figura 32. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 2, repetición 3.

Tal como se calculó para el experimento 1, para el experimento 2 se determinó el contenido de ATA en porcentaje para cada repetición obtenida de cada fase, los promedios de los porcentajes y el RSD empleando las ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente; los resultados de estos cálculos se encuentran consignados en las Tablas 6 y 7, respectivamente para la F.A. y F.O.

Tabla 6. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 2 (relación 1:5) en la F.A



| RELACIÓN 1:5 FASE ACUOSA | | | | |
|--------------------------|----------------------|-------|---------------|----------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 24,39 | 0,48 | 0,70 | 29,00 |
| 2 | 37,37 | 0,75 | | |
| 3 | 44,30 | 0,88 | | |


Tabla 7. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 3 (relación 1:5) en la F.O.

| RELACIÓN 1:5 FASE ORGÁNICA | | | | |
|----------------------------|----------------------|-------|---------------|----------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 1451,49 | 29,02 | 28,05 | 3,00 |
| 2 | 1389,05 | 27,78 | | |
| 3 | 1367,57 | 27,35 | | |

7.2.3. EXPERIMENTO 3 (RELACIÓN 1:10)

Tabla 8. Resultados obtenidos al realizar el experimento 3 (relación 1:10 - Vinaza: ACOET)

| RELACIÓN 1:10 | | | | |
|----------------------|-----|--|--------------|--------------------------|
| Número de repetición | | Imagen | Cromatograma | Concentración ppm de ATA |
| Repetición 1 (1x) | F.O |  <p>Figura 33. Fases obtenidas al realizar el experimento 3 (relación 1:10) repetición 1. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 36 | 48,63 ppm |
| | F.A | | Figura 37 | 28,24 ppm |
| Repetición 2 (2x) | F.O |  <p>Figura 34. Fases obtenidas al realizar el experimento 3 (relación 1:10) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 38 | 50,15 ppm |
| | F.A | | Figura 39 | 15,98 ppm |

| | | | | |
|-------------------|-----|--|-----------|-----------|
| Repetición 3 (3x) | F.O |  <p>Figura 35. Fases obtenidas al realizar el experimento 3 (relación 1:10) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 40 | 49,52 ppm |
| | F.A | | Figura 41 | 11,34 ppm |

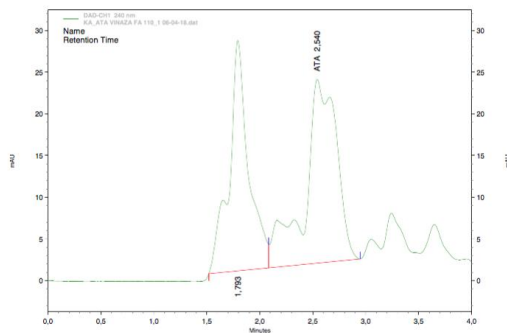


Figura 36. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 3, repetición 1.

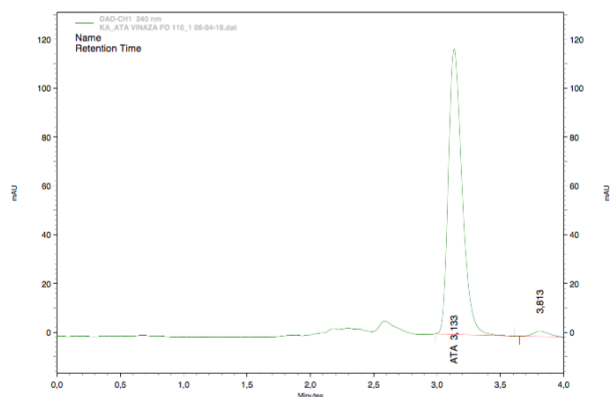


Figura 37. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 3, repetición 1.

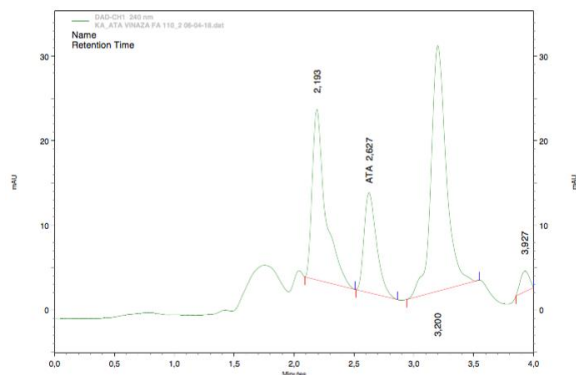


Figura 38. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 3, repetición 2.

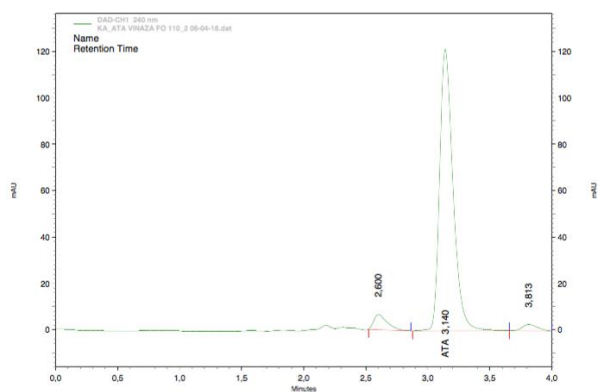


Figura 39. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 3, repetición 2.

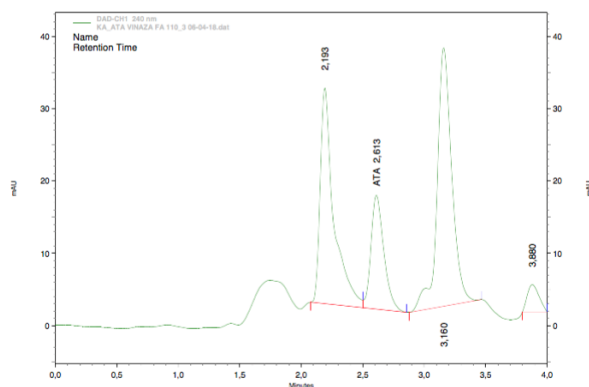


Figura 40. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 3, repetición 3.

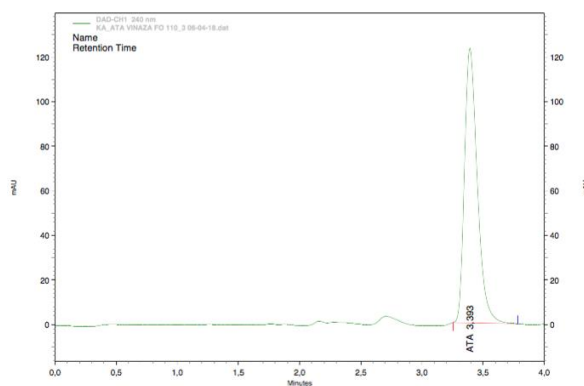


Figura 41. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 3, repetición 3.

De igual manera para este experimento, se calculó el contenido de ATA en porcentaje para cada repetición obtenida de cada fase, los promedios de los porcentajes y el RSD empleando las ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente; los resultados de estos cálculos se encuentran consignados en las Tablas 9 y 10, respectivamente para la F.A y F.O.

Tabla 9. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 3 (relación 1:10) en la F.A.


| RELACIÓN 1:10 FASE ACUOSA | | | | |
|----------------------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|------------------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 24,39 | 0,56 | 0,37 | 46,00 |
| 2 | 15,98 | 0,32 | | |
| 3 | 11,34 | 0,23 | | |


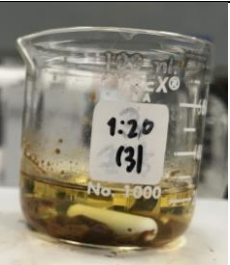
Tabla 10. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 3 (relación 1:10) en la F.O.

| RELACIÓN 1:10 FASE ORGÁNICA | | | | |
|------------------------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|------------------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 48,63 | 0,97 | 0,98 | 2,00 |
| 2 | 50,15 | 1,00 | | |
| 3 | 49,52 | 0,99 | | |

7.2.4. EXPERIMENTO 4 (RELACIÓN 1:20)

Tabla 11. Resultados obtenidos al realizar el experimento 4 (relación 1:20 - Vinaza: ACOET).

| RELACIÓN 1:20 | | | | |
|-----------------------------|------------|---|---------------------|-------------------------------------|
| Número de repetición | | Imagen | Cromatograma | Concentración ppm de ATA |
| Repetición 1 (1x) | F.O |  | Figura 45 | 48,69 ppm |
| | F.A | | Figura 46 | 9,04ppm |
| | | <p>Figura 42. Fases obtenidas al realizar el experimento 4 (relación 1:20) repetición 1. Parte</p> | | |

| | | | | |
|-------------------|-----|---|-----------|-----------|
| | | superior F.O e inferior F.A. | | |
| Repetición 2 (2x) | F.O |  <p>Figura 43. Fases obtenidas al realizar el experimento 4 (relación 1:20) repetición 2. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 47 | 50,32 ppm |
| | F.A | | Figura 48 | 7,78 ppm |
| Repetición 3 (3x) | F.O |  <p>Figura 44. Fases obtenidas al realizar el experimento 4 (relación 1:20) repetición 3. Parte superior F.O e inferior F.A.</p> | Figura 49 | 53,99 ppm |
| | F.A | | Figura 50 | 8,33 ppm |

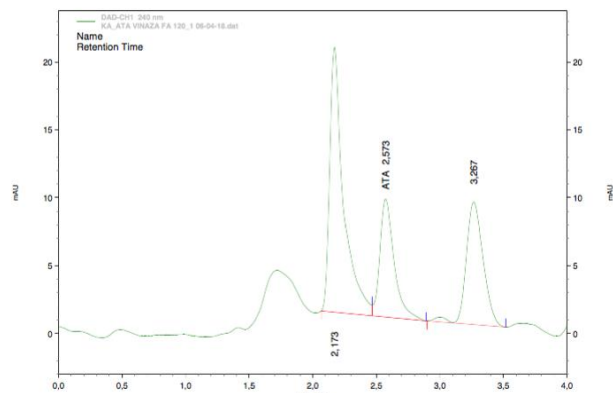


Figura 45. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 4, repetición 1.

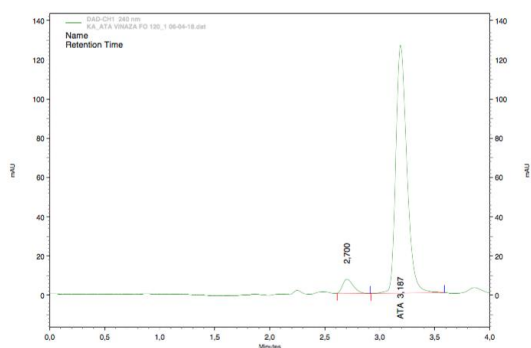


Figura 46. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 4, repetición 1.

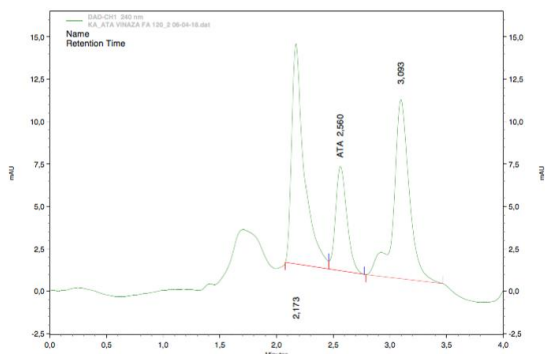


Figura 47. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 4, repetición 2.

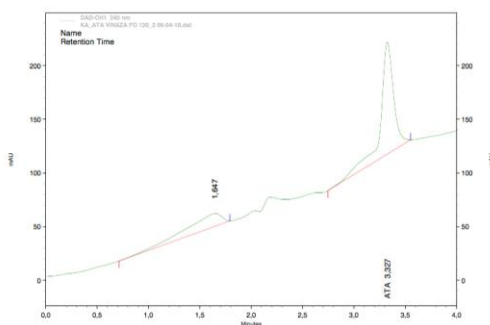


Figura 48. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 4, repetición 2.

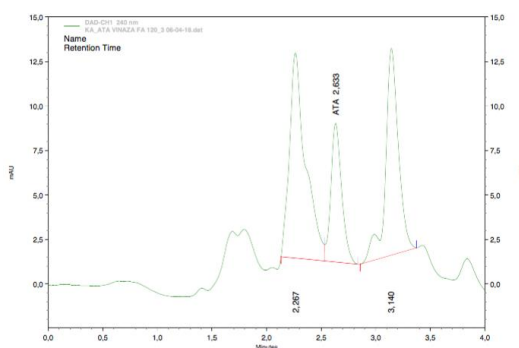


Figura 49. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.A obtenida del experimento 4, repetición 3.

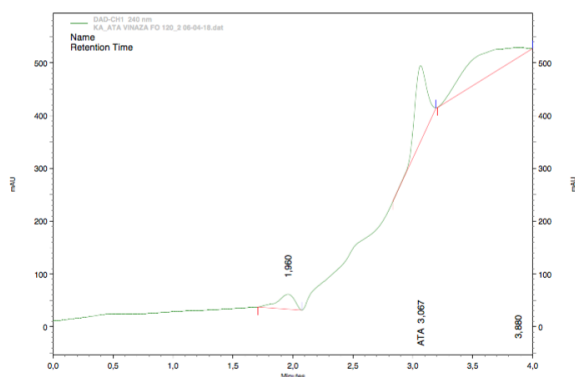


Figura 50. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la F.O obtenida del experimento 4, repetición 3.

Por último, para dar por terminada la etapa del diseño experimental, para este experimento 4, se calculó el contenido de ATA en porcentaje para cada repetición obtenida de cada fase, los promedios de los porcentajes y el RSD empleando las

ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente; los resultados de estos cálculos se encuentran consignados en las Tablas 12 y 13, respectivamente para la F.A y F.O.

Tabla 12. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 4 (relación 1:20) en la F.A.

| RELACIÓN 1:20 FASE ACUOSA | | | | |
|----------------------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|------------------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 9,04 | 0,18 | 0,17 | 6,00 |
| 2 | 7,78 | 0,16 | | |
| 3 | 8,33 | 0,17 | | |

Tabla 13. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en el experimento 4 (relación 1:20) en la F.O.

| RELACIÓN 1:20 FASE ORGÁNICA | | | | |
|------------------------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|------------------|
| REPETICIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 48,69 | 0,97 | 1,01 | 1,00 |
| 2 | 50,15 | 1,00 | | |
| 3 | 49,52 | 0,99 | | |

Los resultados obtenidos y explicados anteriormente no fueron parametrizados de acuerdo con la cantidad inicial de vinaza utilizada, es decir, la cantidad en mL de vinaza empleada para realizar los cuatro experimentos no fue la misma, por tal motivo fue necesario realizar una corrección en términos de la concentración o cantidad de ATA para la F.O (dado que en esta fase se presenta mayor contenido de ATA) de todas las relaciones realizadas, con sus respectivas repeticiones; con el fin de calcular la concentración que se obtendría por experimento al utilizar la misma cantidad en mL de vinaza y así realizar la comparación y elección de la relación con mayor contenido de ATA. Esta corrección se hizo dividiendo la cantidad en ppm de ATA obtenida mediante los cromatogramas de la F.O de todas las relaciones (datos consignados en las Tablas 4, 7, 10 y 13) entre la cantidad en mL reales de vinaza utilizados para cada experimento (ecuación 5), de este modo para la relación 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20, se dividió por 10,00 mL, 5,00 mL, 1,00 mL y 1,00 mL, respectivamente; esperando que al realizar esta operación se obtuviera la concentración de ATA para todas las relaciones asumiendo que se unificaron las cantidades de vinaza tomadas para todos los experimentos. La ecuación 5.1, muestra el cálculo realizado para la repetición 1 de la relación 1:2, de igual forma

se procedió para las demás concentraciones de cada repetición; los resultados obtenidos al efectuar esta corrección se muestran en la Tabla 14.

$$\frac{\text{Concentración de ATA en ppm}}{\text{mL de vinaza utilizados por experimento}} = \text{Concentración de ATA corregida} \quad (5)$$

$$\frac{931,53 \text{ ppm}}{10 \text{ mL}} = 93,15 \text{ ppm} \quad (5.1)$$

Tabla 14. Resultados obtenidos en términos de contenido de ATA en ppm al realizar la corrección parametrizando la cantidad de vinaza inicial utilizada en las repeticiones de cada relación para la F.O.

| RELACIONES | CORRECCIONES AL CONTENIDO DE ATA EN ppm PARA LAS TRES REPETICIONES DE LA FASE ORGÁNICA | | |
|------------|--|--------------|--------------|
| | REPETICIÓN 1 | REPETICIÓN 2 | REPETICIÓN 3 |
| 1:2 | 93,15 | 96,48 | 56,42 |
| 1:5 | 290,29 | 277,81 | 273,52 |
| 1:10 | 48,63 | 50,15 | 49,52 |
| 1:20 | 48,69 | 50,15 | 49,52 |

Con estos resultados corregidos no se observa una tendencia en aumento de la concentración o cantidad de ATA que permita realizar una comparación y elección de la relación con mayor cantidad de ATA. Sin embargo, teniendo en cuenta los siguientes tres puntos se estableció como relación óptima la relación másica de 1:5 para efectuar la extracción de ATA a escala semipiloto. En primer lugar, tal como se especificó anteriormente, al reproducir a escala semipiloto las condiciones establecidas para realizar la extracción de ATA a escala laboratorio, no se observó separación de las fases en las relaciones 1:2, 1:3 y 1:4, pero sí en la relación 1:5. En segundo lugar, los resultados obtenidos mediante este diseño experimental (los corregidos y los no corregidos) muestran que para la relación 1:5 hay mayor cantidad de ATA en la F.O en comparación con las demás relaciones. Y en tercer lugar, al evaluar la viabilidad de utilizar las relaciones 1:10 y 1:20 a escala

semipiloto, se infiere que en el caso de utilizarlas no se estaría optimizando la extracción de ATA a partir de vinazas residuales, puesto que esta materia prima estaría en una proporción muy baja teniendo en cuenta que es un gran contenido en Litros de ACOET (10 y 20 veces más que la vinaza) y la proporción del subproducto utilizado sería mínima (menos de 1,00 L).

7.3. EXTRACCIÓN A ESCALA SEMIPILOTO

A continuación, se presentan los resultados obtenidos al realizar tres extracciones de ATA a escala semipiloto empleando la planta de extracción semipiloto de la Universidad Icesi. Para cada extracción se siguieron las siguientes condiciones:

1. pH= 2,00.
2. Tiempo de extracción con agitación constante de 3,0 horas.
3. Temperatura ambiente 20°C – 25 °C.
4. Relación másica 1:5 (vinaza: ACOET) determinada tal como se explica en el ítem anterior.

Cabe resaltar que, para realizar cada una de las extracciones descritas a continuación se siguieron los parámetros establecidos en el Protocolo de extracción de ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto (Anexo 1); esto con el fin de asegurar la reproducibilidad de la extracción de ATA a escala semipiloto empleando la planta de extracción semipiloto de la Universidad Icesi. Es importante destacar que, las cantidades empleadas de la muestra de vinaza y solvente ACOET fueron diferentes para cada extracción debido a la disponibilidad que se tenía de dicho solvente, pero para cada extracción se aseguró la relación másica óptima obtenida de 1:5.

7.3.1. PRIMERA EXTRACCIÓN EN PLANTA SEMIPILOTO

Los resultados obtenidos al realizar la primera extracción, siguiendo las condiciones y protocolo establecido, fueron:

1. Preparación de la muestra:
La muestra de vinaza fue llevada a pH de 2,08.
2. Carga al sistema:
Siguiendo la relación másica óptima obtenida: se midieron 2,59 L de vinaza y 12, 95 L de ACOET, la ecuación 6 representa el cálculo para establecer la cantidad de ACOET que se midieron para asegurar la relación másica 1:5. (ecuación 6.1 muestra del cálculo).

Según las especificaciones dadas por Process Solutions and Equipment PSE S.A.S, fabricantes de la planta de extracción, el percolador donde se introduce la muestra (vinaza) y el solvente (ACOET) previamente medidos, tiene una capacidad es de 20,00 L y éste debe ser llenado a un 80,00 %, es decir debe ser llenado a un volumen máximo de 16,00 L (ecuación 7); así que, se hizo necesario realizar el cálculo del volumen total en litros adicionados al percolador en esta extracción (ecuación 8), el cual fue de 15,54 L (ecuación 8.1).

$$\text{Litros vinaza} \times 5 = \text{Litros de ACOET} \quad (6)$$

$$2,59 \text{ L vinaza} \times 5 = 12,95 \text{ L de ACOET} \quad (6.1)$$

$$20,00 \text{ L Cap. total percolador} \times \frac{80,0\%}{100,0\%} = 16,00 \text{ L vol. máx. percolador} \quad (7)$$

$$\text{Litros vinaza} + \text{Litros ACOET} = \text{Litros totales adicionados al percolador} \quad (8)$$

$$2,59 \text{ L vinaza} + 12,95 \text{ L ACOET} = 15,54 \text{ L totales} \quad (8.1)$$

3. Recolección de las fases:

Pasadas las tres horas de extracción con agitación constante, se obtuvieron dos fases y se realizó el cálculo del volumen total recolectado (ecuación 9), las cuales fueron recolectadas según su orden de salida, la primera la F.A, con un volumen recolectado de 10,00 L y la segunda la F.O con un volumen de 5,00 L, para un total de 15,00 L (ecuación 9.1); obteniéndose, con una pérdida (ecuación 10) de 0,54 L en el proceso de extracción (ecuación 10.1).

$$\text{Litros de F.A. recolectada} + \text{Litros de F.O recolectada} = \text{Litros de volumen recolectado} \quad (9)$$

$$10,00 \text{ L de F.A. recolectada} + 5,00 \text{ L de F.O recolectada} = 15,00 \text{ L de volumen recolectado} \quad (9.1)$$

$$\begin{aligned} &\text{Litros volumen total adicionado al percolador} - \\ &\text{Litros volumen recolectado después de la extracción} = \\ &\text{Litros perdidos en el proceso de extracción} \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} &15,54 \text{ L volumen total adicionado al percolador} - \\ &15,00 \text{ L volumen recolectado después de la extracción} = \\ &0,54 \text{ L perdidos en el proceso de extracción} \end{aligned} \quad (10.1)$$

Tal como se mencionó, la F.A. fue entregada al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Icesi, para su uso como precursor de la digestión anaeróbica, teniendo

en cuenta que en esta fase no presenta un porcentaje de ATA significativo en comparación con la F.O; sin embargo, se realizó la cuantificación de ATA en la F.A para esta primera extracción a escala semipiloto, el resultado obtenido se muestra en la Figura 51.

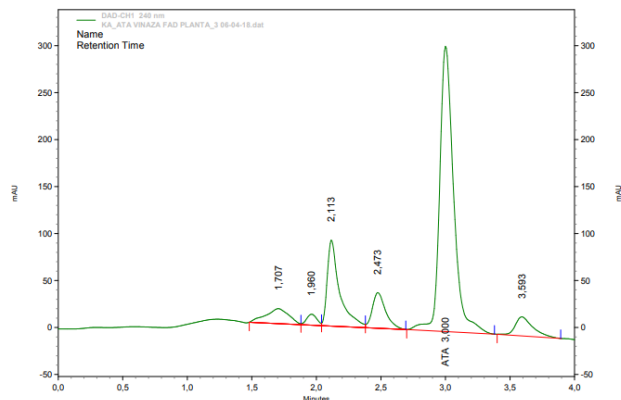


Figura 51. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase acuosa de la extracción 1 a escala semipiloto.

4. Concentración de la F.O y recuperación del ACOET:

La F.O fue concentrada en la planta de extracción y simultáneamente se realizó la recuperación del solvente siguiendo el protocolo (Anexo 1). Una vez concentrada la muestra de F.O, se realizó el cálculo para determinar la cantidad de litros total obtenida en este paso (ecuación 11), es decir se obtuvieron 1,90 L de F.O concentrada y 2,90 L de ACOET recuperado, para un total de 4,80 L (ecuación 11.1); obteniendo a partir de la ecuación 12 una pérdida de 0,20 L, teniendo en cuenta el volumen de 5,00 L adicionado de F.O para concentrar, el volumen recolectado de la F.O concentrada y ACOET recolectado el cual fue de 4,80 L (ecuación 12.1).

$$\begin{aligned} & \text{Litros de F.O concentrada} + \\ & \text{Litros de ACOET recuperado} = \text{Litros totales} \end{aligned} \tag{11}$$

$$\begin{aligned} & 1,90 \text{ L de F.O concentrada} + \\ & 2,90 \text{ L de ACOET recuperado} = 4,80 \text{ L totales} \end{aligned} \tag{11.1}$$

$$\begin{aligned} & \text{Litros de F.O para concentrar} - \text{Litros volumen total recuperado} = \\ & \text{Litros de pérdida} \end{aligned} \tag{12}$$

$$\begin{aligned} & 5,00 \text{ L de F.O para concentrar} - 4,80 \text{ L volumen total recuperado} = \\ & 0,20 \text{ L de pérdida} \end{aligned} \tag{12.1}$$

5. Tratamiento de la muestra de la F.O concentrada:

La muestra de F.O concentrada obtenida de 1,90 L fue introducida a un balón con peso de 314,500 g, y se llevó al equipo: rotaevaporador, con el fin de eliminar residuos de ACOET y agua siendo las condiciones establecidas en el protocolo (Anexo 1); esto con el fin de llevar a sequedad la muestra.

Una vez se obtuvo la muestra seca se pesó arrojando como resultado 473,88 g; aplicando la ecuación 13 se calculó el peso de biomasa seca de ATA de 159,88 g (ecuación 13.1). A dicha muestra de biomasa de ATA obtenida, se le realizó la respectiva cuantificación por HPLC siguiendo los lineamientos establecidos en el ítem 6.6.1. para la preparación de la muestra para HPLC.

$$g \text{ peso balón y muestra} - g \text{ peso balón vacío} = g \text{ de biomasa seca de ATA.} \quad (13)$$

$$473,88 \text{ g peso balón y muestra} - 314,50 \text{ g peso balón vacío} = 159,88 \text{ g de biomasa seca de ATA.} \quad (13.1)$$

Al realizar la cuantificación de ATA de esta biomasa proveniente de la F.O se obtuvo una concentración de 2201,20 ppm (Figura 52) y al emplear la ecuación 2 arrojó un porcentaje de contenido de ATA de 44,00%.

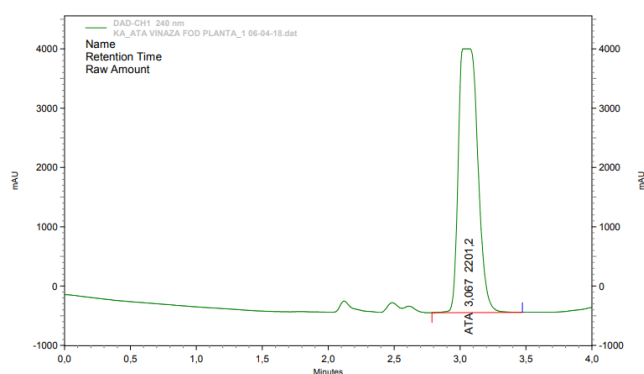


Figura 52. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase orgánica seca (biomasa de ATA) de la extracción 1 a escala semipiloto.

7.3.2. SEGUNDA EXTRACCIÓN EN PLANTA SEMIPILOTO

Los resultados obtenidos al realizar la segunda extracción, siguiendo las condiciones y protocolo establecido, fueron:

1. Preparación de la muestra:
La muestra de vinaza fue llevada a pH de 2,08.
2. Carga al sistema:

Siguiendo la relación másica óptima obtenida: se midieron 1,40 L de vinaza y 7,00 L de ACOET, establecidos empleando la ecuación 6 para asegurar la relación másica 1:5; con un volumen total en litros adicionados al percolador en esta extracción de 8,40 L (ecuación 8).

3. Recolección de las fases:

Pasadas las tres horas de extracción con agitación constante, se obtuvieron dos fases, la primera la F.A, con un volumen recolectado de 4,50 L y la segunda la F.O con un volumen de 3,70 L, para un total de 8,20 L (cálculo realizado empleando la ecuación 9); con una pérdida de 0,20 L en el proceso de extracción (ecuación 10).

De igual forma, la F.A fue entregada al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Icesi, para su uso como precursor de la digestión anaeróbica, teniendo en cuenta que en esta fase no presenta un porcentaje de ATA significativo en comparación con la F.O.

4. Concentración de la F.O y recuperación del ACOET:

Una vez concentrada la muestra de F.O se obtuvieron 1,00 L de F.O Concentrada y 1,70 L de ACOET recuperado, para un total de 2,70 L (ecuación 11); con una pérdida de 1,00 L, teniendo en cuenta el volumen de 3,30 L adicionado de F.O para concentrar, el volumen recolectado de la F.O concentrada y ACOET recolectado el cual fue de 1,70 L (cálculo realizado empleando la ecuación 12).

5. Tratamiento de la muestra de la F.O concentrada:

La muestra de F.O concentrada obtenida de 1,00 L fue introducida a un balón con peso de 185,150 g, y se llevó al equipo: rotaevaporador. La muestra seca arrojó un peso total de 223,72 g, obteniendo un peso de biomasa seca de ATA de 38,57 g (ecuación 13). A esta muestra de biomasa de ATA se le realizó la respectiva cuantificación por HPLC siguiendo los lineamientos establecidos en el ítem 6.6.1. para la preparación de la muestra para HPLC.

La biomasa seca de ATA cuantificada por HPLC arrojó una concentración de 1319,50 ppm (Figura 53) y se estimó un porcentaje de contenido de ATA de 26,39% por medio de la ecuación 2.

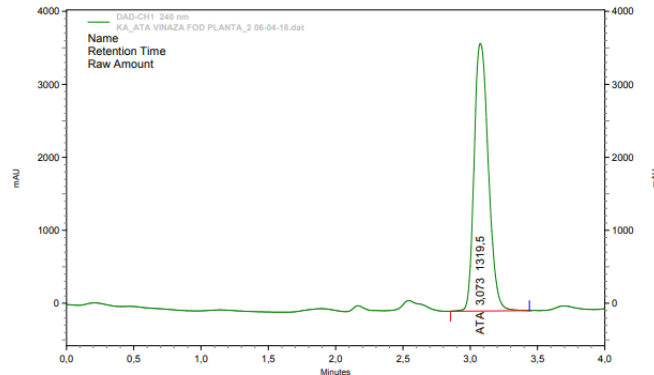


Figura 53. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase orgánica seca (biomasa de ATA) de la extracción 2 a escala semipiloto.

7.3.3. TERCERA EXTRACCIÓN EN PLANTA SEMIPILOTO

Los resultados obtenidos al realizar la tercera y última extracción a escala semipiloto, siguiendo las condiciones y protocolo establecido, fueron:

1. Preparación de la muestra:
La muestra de vinaza fue llevada a pH de 2,08.
2. Carga al sistema:
Siguiendo la relación másica óptima obtenida: se midieron 1,70 L de vinaza y 8,60 L de ACOET, establecidos empleando la ecuación 6 para asegurar la relación másica 1:5; con un volumen total en litros adicionados al percolador en esta extracción de 10,30 L (ecuación 8).
3. Recolección de las fases:
Pasadas las tres horas de extracción con agitación constante, se obtuvieron las dos fases. La primera la F.A, con un volumen recolectado de 4,50 L y la segunda, la F.O con un volumen de 6,15 L, para un total de 9,90 L (ecuación 9); con una pérdida de 0,40 L en el proceso de extracción (cálculo realizado empleando la ecuación 10).
De igual forma, la F.A. fue entregada al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Icesi.

4. Concentración de la F.O y recuperación del ACOET:
Una vez concentrada la muestra de F.O se obtuvieron 1,00 L de FO Concentrada y 2,70 L de ACOET recuperado, para un total de 3,75 L (ecuación 11) con una pérdida de 0,00 L, teniendo en cuenta el volumen de 3,75 L adicionado de F.O para concentrar, el volumen recolectado de la F.O concentrada y ACOET recolectado el cual fue de 2,75 L (ecuación 12).

5. Tratamiento de la muestra de la F.O concentrada:
La muestra de F.O concentrada obtenida de 1,00 L fue introducida a un balón con peso de 185,150 g, y se llevó al equipo: rotaevaporador. Se obtuvo un peso de 223,72 g de muestra seca + balón y a partir de este peso se calculó, por medio de la ecuación 13, el peso de biomasa seca de ATA de 38,57 g. A dicha muestra de biomasa de ATA obtenida se le realizó la respectiva cuantificación por HPLC siguiendo los lineamientos establecidos en el ítem 6.6.1.

En la cuantificación de ATA de la biomasa seca de ATA se obtuvo una concentración de 1165,50 ppm (Figura 54) y con un porcentaje de contenido de ATA de 23,31%, calculado mediante la ecuación 2.

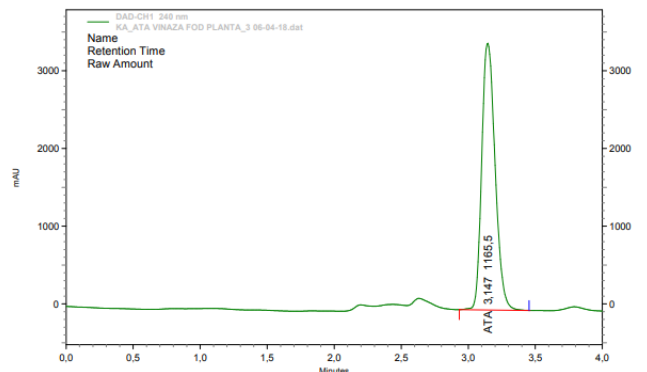


Figura 54. Cromatograma del ácido trans-aconítico obtenido a partir de la muestra de la fase orgánica seca (biomasa ATA) de la extracción 3 a escala semipiloto.

Cuantificadas las concentraciones en ppm y calculados los porcentajes de ATA de cada biomasa de ATA obtenida de cada una de las tres extracciones (Figura 55), los cuales se encuentran registrados en la Tabla 11, se procedió a calcular el

promedio de los mismos, el cual fue de 31,25%. Adicionalmente, en la Tabla 11, se registró el RSD obtenido, el cual fue de 36,00%, dato calculado empleando las ecuaciones 3 y 4, respectivamente.

Tabla 15. Resultados obtenidos en términos de porcentaje de ATA en las tres extracciones realizadas a escala semipiloto.

| EXTRACCIONES A ESCALA SEMIPILOTO | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|---------------|----------|
| EXTRACCIÓN | CONCENTRACIÓN ppm | % ATA | PROMEDIO % | RSD % |
| 1 | 2201,20 | 44,00 | 31,25 | 36,00 |
| 2 | 1319,50 | 26,39 | | |
| 3 | 1165,50 | 23,35 | | |

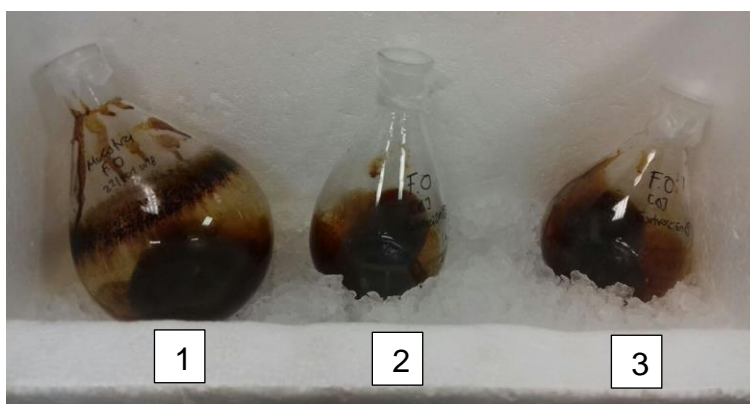


Figura 55. Biomasa de ATA obtenida de las tres extracciones a escala semipiloto realizadas. (1), (2) y (3) Biomasa de ATA obtenida de las extracciones 1, 2 y 3, respectivamente.

8. DISCUSIÓN

La vinaza puede definirse como el efluente resultante de la producción de alcohol a partir de la fermentación y la destilación de residuos de caña de azúcar; (Zúñiga & Gandini, 2013) esta se caracteriza por ser un líquido de color marrón, presentar pH bajo y gran contenido de compuestos orgánicos suspendidos (García & Rojas, 2005), tales como los presentados en la Figura 4; dentro de los cuales se encuentra el ácido aconítico, el cual presenta dos isómeros, cis y trans (Figura 5), siendo el isómero trans es el más estable de los dos (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2013).

Al realizar la cuantificación por HPLC de una muestra de vinaza recién recolectada del proceso de producción de bioetanol del Ingenio Manuelita, se confirmó lo

anteriormente descrito: la presencia del isómero trans, es decir, la presencia del ácido trans-aconítico (ATA), en un porcentaje de 2,79% y la evidencia de la presencia de otros ácidos orgánicos en la vinaza, al observar señales adicionales en el cromatograma arrojado al realizar la cuantificación (Figura 13). Cabe resaltar que dicha muestra presentaba un pH de 4,42, con lo cual se afirma lo reportado en teoría, la vinaza se caracteriza por presentar pH bajos.

La muestra de vinaza descrita anteriormente fue llevada a un pH de 2,08, y para este caso el porcentaje de ATA presente fue de 13,31 % (Figura 14). Se obtuvo un aumento en la concentración en términos de porcentaje cuantificada de ATA, esto se puede deber a que este ácido, tal como se muestra en la Figura 5 y ha sido descrito en el marco teórico, presenta en su estructura química tres hidrógenos ionizables, los cuales tienen un pKa de 2,8, 4,6, y 6,3 (Malmay, y otros, 1995), y a un pH menor (2,08) al pKa de sus hidrógenos éste ácido orgánico se encuentra en su forma no disociada, por tanto, mantener un pH de 2,0 (menor al pKa de los hidrógenos ionizables) asegura la presencia y cuantificación en mayor proporción del ATA. Por otra parte, para restringir la disociación del ATA, realizar y mejorar su extracción, tal como ha sido especificado en el marco teórico, se emplea el solvente acetato de etilo (ACOET); puesto que con este solvente se obtiene un rendimiento de 34,00 – 69,00 % y una pureza de 99,90% de ATA (Gil, 2007) y ello se ilustra en la Figura 6.

De esta manera, conociendo el pH 2,0 confirmado mediante este proyecto investigativo, el solvente adecuado, la temperatura y el tiempo para realizar la extracción líquido-líquido de ATA, estos últimos determinados en proyectos anteriores, se hizo necesaria establecer la relación másica óptima en términos de la cantidad en volumen de vinaza a pH 2,0 y ACOET para llevar a cabo la extracción del mismo a escala semipiloto. El resultado de la relación másica óptima se determinó al reproducir a escala semipiloto las condiciones establecidas a escala laboratorio (relación 1:2), con la cual no se encontró separación de las fases y por tal motivo, se procedió a realizar las extracciones con relaciones de 1:3, 1:4 y 1:5, respectivamente; las dos primeras al igual que en la relación 1:2, no presentaron separación mientras que con la última relación (1:5) si se obtuvo separación. Para corroborar dichos resultados se efectuaron cuatro experimentos a escala laboratorio cada uno por triplicado mencionados en el ítem 6.4. y con los cuales se obtuvieron los siguientes hallazgos.

En primer lugar, al terminar el tiempo de extracción con agitación constante de tres horas, para los cuatro experimentos se obtuvieron dos fases (Tablas 2, 5, 8 y 11); denominadas fase acuosa F.A y fase orgánica F.O, la primera fase o fase acuosa contenía el componente a separar, y una vez realizada la extracción este componente fue transferido a la segunda fase o fase orgánica donde se encontraba el solvente. Tal como se reporta en la teoría, en esta extracción se pueden distinguir tres componentes: la vinaza acidificada que contiene el componente a separar o primera fase, el componente transferido (ATA), y el solvente ACOET o segunda fase

utilizado para extraer el ATA de la vinaza. Así que, lo obtenido es consecuente respecto al tipo de extracción realizada (líquido- líquido), la cual se basa en la distribución de los componentes a separar entre dos fases líquidas involucradas, es decir, el compuesto a extraer se transfiere de la primera fase a la segunda.

En segundo lugar, al realizar la cuantificación de ATA en cada fase obtenida, se encontró que la F.A para las cuatro extracciones con sus respectivas repeticiones presentaban un contenido bajo de ATA; se obtuvieron en promedio 0,75% de ATA con una Desviación Estándar relativa de RSD de 14,00%, es decir ($0,75 \pm 14,00\%$), $0,70 \pm 28,00\%$, $0,37 \pm 6,00\%$ y $0,17 \pm 5,00\%$ (Tablas 3, 6, 9 y 12), para los experimentos 1, 2, 3, y 4, respectivamente. Esto tiene sentido debido a lo explicado anteriormente, el ATA es transferido de la primera fase F.A a la segunda fase F.O, y por tanto su cuantificación en la F.A es baja en comparación a la cantidad presente de ATA en la F.O, lo cual se explica a continuación. Cabe resaltar que la desviación relativa estándar o por sus siglas en inglés RSD, es la relación entre desviación y promedio (Brennan, 2018).

En tercer lugar, los resultados obtenidos al realizar la cuantificación de ATA en la F.O obtenida para cada repetición de los cuatros experimentos realizados, arrojaron los siguientes resultados en promedio de contenido de ATA expresado en porcentajes, $16,26 \pm 28,00\%$, $28,05 \pm 3,00\%$, $0,98 \pm 2,00\%$ y $1,01 \pm 5,00\%$, para los experimentos 1, 2, 3 y 4 (Tablas 4, 7, 10 y 13), respectivamente. Con estos resultados se puede inferir que la F.O presenta mayor contenido de ATA que la F.A y que la relación másica por medio de la cual se obtuvo mayor contenido en porcentaje de ATA en promedio fue la relación 1:5 del experimento 2, con un porcentaje de 28,05%, el cual es mayor en comparación con los demás porcentajes de ATA en promedio obtenidos.

En cuarto lugar, para realizar el diseño experimental y para la obtención de los resultados explicados anteriormente, la cantidad de vinaza inicial utilizada no fue igual en todos los experimentos, por tal motivo, se hizo necesario realizar una corrección en términos de la concentración o cantidad de ATA en ppm para la F.O de todas las relaciones realizadas, con sus respectivas repeticiones. Los resultados corregidos se muestran en la Tabla 14, pero con estos no se observa una tendencia en aumento de la concentración que permita realizar una comparación y elección de la relación con mayor cantidad de ATA; así que, se estableció como relación óptima la relación másica de 1:5 para efectuar la extracción de ATA a escala semipiloto teniendo en cuenta tres razonamientos: el primero, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, al no observar separación de las fases a escala semipiloto en las relaciones 1:2, 1:3 y 1:4, pero sí en la relación 1:5. El segundo, los resultados obtenidos mediante el diseño experimental realizado (los corregidos y los no corregidos) muestran que para la relación 1:5 hay mayor cantidad de ATA en la F.O en comparación con las demás relaciones. Y el tercero, en caso de utilizar las relaciones 1:10 y 1:20 a escala semipiloto, la vinaza estaría en una proporción muy baja teniendo en cuenta que es un gran contenido en Litros de ACOET (10 y

20 veces más que la vinaza) y no es viable utilizar la planta semipiloto para una proporción tan baja de materia prima.

Con respecto a las tres extracciones realizadas a escala semipiloto, estas se realizaron siguiendo las tres condiciones establecidas en el proyecto de grado anterior (muestra de vinaza a pH 2,0, temperatura ambiente de 20°C – 25°C y tiempo de extracción con agitación constante de tres horas), adicionalmente, se incluyó la condición establecida mediante este proyecto investigativo cuyo resultado se mencionó anteriormente, relación másica 1:5.

Para las tres extracciones, tal como para la extracción de ATA en el diseño experimental, se obtuvieron dos fases la F.A y F.O; la primera, fue entregada al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Icesi, teniendo en cuenta los resultados arrojados por el diseño experimental por medio de los cuales se infiere que en esta fase el ATA se encuentra en baja cantidad respecto a la cantidad que se cuantifica en la FO, además, el cromatograma arrojado al realizar la cuantificación de ATA de la F.A obtenida en la primera extracción (Figura 51) se muestra un pico menor de ATA en comparación a las unidades mAU (milésima de una unidad de absorbancia o unidad de absorbancia a partir de espectroscopia UV-visible) del arrojado por el cromatograma obtenido a partir de la biomasa seca de la F.O (Figura 52). Esta comparación se realiza respecto a la altura de los picos obtenidos, las mAU obtenidas para el pico de ATA cuantificado de la F.A tiene un máximo de 300 mAU mientras que el pico de ATA cuantificado de la F.O tiene alrededor de 3900 mAU de altura máxima, así que en altura, el pico de ATA obtenido a partir de la F.O se presenta 13 veces más que el pico de ATA obtenido a partir de la F.A, y con ello mayor contenido de ATA en la F.O. Cabe resaltar que, la mencionada F.O recibió un tratamiento por medio del cual se eliminó el solvente ACOET, agua remanente y se llevó a sequedad obteniendo en total para las tres extracciones un peso de 239,32 g de biomasa de ATA (Figura 55), los cuales fueron entregados al grupo de investigación en Productos Naturales, para su posterior purificación del ATA.

A cada una de las muestras de biomasa de ATA obtenidas de cada extracción se les realizó la respectiva cuantificación de ATA por HPLC, obteniendo un porcentaje de 44,00%, 26,39% y 23,35% de ATA para cada biomasa de las extracciones 1, 2 y 3, respectivamente; con un promedio de 31,25 % y un RSD de 36,00% (Tabla 15), esta variación se debe principalmente a que todo el proceso es manual, las fases se recolectan del percolador de manera manual, así que la separación de las dos fases está limitada por la agilidad y rapidez con la cual se cambie de erlenmeyer para recolectar las dos fases, además, durante el proceso el extracción se presentan pérdidas que si bien son pequeñas (tal como se describe en los resultados) interfieren en la cuantificación total del ATA. A pesar de esta pequeña variación, se asegura reproducibilidad de la extracción de ATA a escala semipiloto

siguiendo las condiciones mencionadas que conforman el procedimiento de extracción a escala semipiloto (Anexo 1).

9. CONCLUSIONES

9.1. Se determinó el procedimiento de extracción a escala semipiloto del ácido trans-aconítico (ATA), manteniendo las condiciones de temperatura, pH y tiempo de extracción establecidas en proyectos anteriores, y estableciendo la relación másica óptima de 1:5 (experimento 2) para realizar dicha extracción, dado que en este se presentó un mayor porcentaje de ATA en comparación con los demás experimentos realizados.

9.2. Se cuantificó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) el contenido extraído del ácido trans-aconítico (ATA) de todas las extracciones de ATA realizadas encontrándose que el contenido en porcentaje de ATA en la fase acuosa es mucho menor en comparación con el contenido presente de ATA en la fase orgánica.

9.3. Se aseguró la reproducibilidad del procedimiento de extracción del ácido trans-aconítico (ATA) empleando la planta semipiloto, manteniendo las condiciones de temperatura, pH y tiempo de extracción establecidas en proyectos anteriores, y la relación másica óptima de 1:5 (experimento 2) determinada mediante el presente proyecto.

9.4. Se realizó el Protocolo de extracción del ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto.

10. RECOMENDACIONES

10.1. Una vez obtenida la muestra de vinaza proveniente del Ingenio Manuelita, ésta debe almacenarse en el refrigerador, con el fin de evitar degradación de la misma; además debe procesarse en un periodo de tiempo no menos de 2 meses.

10.2. Para realizar las extracciones a escala semipiloto empleando la planta de extracción de la Universidad ICESI, se deben seguir los lineamientos consignados en el Protocolo de extracción de ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto (Anexo 1.)

10.3. Buscar una alternativa más eficaz para realizar la recolección de las fases una vez termine la extracción en la planta semipiloto.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J., Magaña, R., Martínez, S., Gómez, A., Ramírez, J., Barajas, R., . . . García, D. (2010). Caracterización nutricional y uso de la caña de azúcar y residuos transformados en dietas para ovinos. *scielo*, 10.
- ASOCAÑA. (13 de 11 de 2017). *El sector azucarero colombiano en la actualidad*. Obtenido de Sector agroindustrial de la caña : <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>
- Brennan, J. (1 de Febrero de 2018). Obtenido de Método para calcular la desviación estándar relativa de una titulación: <https://www.geniolandia.com/13142324/metodo-para-calculer-la-desviacion-relativa-de-una-titulacion>
- Carretero, F. (2006). Procesos de fabricación de bebidas. *Innovación tecnológica en la industria de bebidas*, 283.
- Centro de desarrollo UNIVERSIA. (2012). ¿Cómo mejorar el uso de las vinazas de caña de azúcar? *UNIVERSIA*, 2.
- Cruz, K., & Villegas, N. (2017). *Protocolo de extracción de compuestos volátiles, oleoresinas, polares y medianamente polares presentes en la pasta de ají habanero empleando la planta de extracción semipiloto*. Santiago de Cali: Universidad ICESI.
- García, A., & Rojas, C. (2005). Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. *Tecnicaña*, 2-11.
- García, C. (2008). Capítulo 4: Bioetanol. En C. García, *Biocombustibles: ¿energía o alimento?* (pág. 27). Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Gil, N. (2007). *Aconitic acid from sugarcane: production and industrial application*. Louisiana State : Louisiana State University and Agricultural and Mechanical Collage.
- Malmay, G., Monteil, F., Molinier, J., Hanine, H., Conte, T., & Mourgues, J. (1995). Recovey of aconitic acid from simulated aqueous efflients of the sugar-cane industry through liquid-liquid extraction. *Biosource Technology*, 33-36.
- Montoya, G., Londoño, J., Cortés, P., & Izquierdo, O. (2014). Quantitation of trans-aconitic acid in different stages of the sugar-manufacturing process. *J Agric Food Chem*, 22.

- Muller, E. (2002). *Liquid-liquid Extraction*. Obtenido de <http://www.interscience.wiley.com>.
- Orozco, S. (2016). *Validación del método cromatográfico HPLC-DAD para la determinación de Ácido trans-aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar*. Santiago de Cali: Universidad ICESI.
- Páez, G., Muñoz, F., Candela, L., Tamoh, K., & Valdes-Abellan, J. (2016). Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). *ELSEVIER*, 410-419.
- Perafán, f. (01 de 11 de 2009). *Entidades azucareras*. Obtenido de Azúcar de caña: <http://www.perafan.com/azucar/ea02enti.html>
- Process solutions and equipment PSE S.A.S. (2016). *Manual de operación planta de extracción sólido líquido REF. PESL*. Bogota, DC: Versión 01.
- Ruiz, J. (2016). *Establecimiento de condiciones de extracción de ácido trans-aconítico a partir de vinazas residuales mediante cromatografía líquida*. Santiago de Cali: Universidad ICESI.
- Singer, J. G. (1981). Combustion, fossil power systems: a reference book on fuel burning and steam generation. En J. G. Singer, *Combustion engineering* (pág. 20). Australia: Libraries Australia.
- Stryer, L., Berg, J., & Tymoczko, J. (2013). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté.
- Vásquez, E. (2014). *Síntesis y caracterización de un material polimérico a partir del ácido trans-aconítico*. Santiago de Cali: Universidad Icesi.
- Zapata, N. J. (2007). Aconitic acid from sugar cane: production and industrial application.
- Zúñiga, V., & Gandini, M. (2013). Caracterización ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol. *DYNA Portal de revistas de la Universidad Nacional de Colombia*, 7.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción de ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto.



ANEXO 2. Protocolo de extracción de ácido trans-aconítico (ATA) a partir de vinazas residuales a escala semipiloto.

I: LAF-001-03
 VS: 2 de 18
 JE EMISION:
 BR/2018

| | | |
|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| REALIZADO POR Katherine Apachi | | |
| Firma: <u>Katherine Apachi Rojas</u> | Firma: _____ | Firma: _____ |
| Cargo: Estudiante de Química Farmacéutica | Cargo: Asesor de proyecto de grado | Cargo: Director de proyecto de grado |
| Fecha: 19/ABR/2018 | Fecha: _____ | Fecha: _____ |

1. OBJETIVOS

- 1.1. Establecer el protocolo de extracción de Ácido Trans-Aconítico presente en la vinaza empleando como solvente el Acetato de Etilo.
- 1.2. Determinar la metodología para el proceso de extracción de Ácido Trans-Aconítico haciendo uso de la planta de extracción semipiloto.
- 1.3. Describir las operaciones involucradas en el tratamiento de las fases obtenidas en el proceso de extracción de Ácido Trans-Aconítico en la planta de extracción.

2. ALCANCE

Este documento está dirigido a personal del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad ICESI y demás interesados en realizar la extracción de Ácido Trans-aconítico a partir de vinazas residuales.

Las vinazas son los residuos que se obtienen después del proceso de destilación de azúcares fermentados de la caña de azúcar; está compuesta por materiales orgánicos y nutrientes minerales que hacen parte de compuestos y constituyentes vegetales, dado que su origen es la planta de caña, tales como: aminoácidos, proteínas, lípidos, ácidos diversos, enzimas, bases ácidos nucleicos, clorofila, lignina, quinonas, ceras y azúcares (García & Rojas, 2005).

Entre los componentes orgánicos de mayor concentración presentes en la vinaza, se encuentra el ácido aconítico, un ácido alifático insaturado tribásico, de fórmula molecular $C_8H_{12}O_6$ que presenta dos isómeros geométricos Cis y Trans, ambos se producen naturalmente en las plantas de caña de azúcar en proporciones variables mediante el ciclo de Krebs, pero el isómero trans es el más estable de los dos; puesto que, en condiciones adecuadas de temperatura y pH, el isómero cis forma una mezcla en equilibrio en la que predomina el isómero trans (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2013). Esta propiedad le permite al ácido trans-aconítico (ATA) ser un candidato adecuado para la formación de polímeros amorfos, ramificados e insolubles en agua, tras una reacción de condensación con 1,6 diaminohexano (Vásquez, 2014) y, por lo tanto, se utiliza cada vez más en la industria de procesamiento de alimentos como un acidulante o intermediario reactivo en la síntesis orgánica de plastificantes y tensoactivos (Malmay, y otros, 1995).

Para realizar la extracción del ATA a partir de las vinazas residuales se han empleados varios métodos entre los más frecuentemente empleados están: precipitación, extracción por intercambio iónico y extracción líquido-líquido, siendo este último el más empleado a escala laboratorio y semipiloto (planta de extracción).

4. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

- 4.1. Se recomienda que el procedimiento se realice entre dos personas para evitar accidentes, respaldar y/o relevar en las actividades del proceso.

- 4.2. La(s) persona(s) encargada(s) de la extracción debe seguir paso a paso el procedimiento de acuerdo con el protocolo.
- 4.3. La(s) persona(s) encargada(s) de la extracción debe seguir las normas de seguridad de vestuario y comportamiento durante el proceso. Teniendo en cuenta que el equipo y el solvente (Acetato de Etilo) utilizados son de alto riesgo.
- 4.4. La(s) persona(s) encargada(s) deben identificar la ubicación de botiquín para primeros auxilios, equipo antiderrame e informar acerca de cualquier eventualidad.

5. DEFINICIONES

- 5.1. **Extracción:** Separación de componentes de una muestra sólida o líquida. La separación se relaciona con las diferencias de solubilidad de los componentes.
- 5.2. **Extracción líquido-líquido:** Transferencia de una sustancia de una fase a otra. En este tipo de extracción se denomina matriz a la solución que contiene el componente a separar, vinaza (A); el componente transferido (ATA) se indica con (C), y el líquido utilizado para extraer el componente C de la matriz, se denomina fase orgánica B (acetato de etilo), tal como se muestra en la Figura 1.

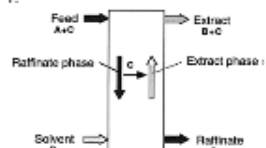


Figura 1. Representación de la extracción líquido-líquido. (Muller, 2002)

- 5.3. **Fase acuosa:** Disolución acuosa. Una vez terminado el tiempo del proceso de extracción en la planta semipiloto, es la primera fase o extracto que se recolecta. Se caracteriza por presentar una consistencia viscosa y coloración marrón (Figura 2) además, tal como lo indica su nombre, presenta mayor proporción de componentes afines agua.




Figura 2. Muestra visual de la fase acuosa.

- 5.4. **Fase orgánica:** Una vez terminado el tiempo del proceso de extracción en la planta semipiloto, es la segunda fase o extracto que se recolecta. Se caracteriza por presentar una consistencia poco viscosa y coloración naranja (Figura 3). Además, es la fase que contiene en mayor proporción el Ácido Trans-aconítico debido a la interacción con el solvente Acetato de Etilo.



Figura 3. Muestra visual de la fase orgánica.

| | | |
|---|--|----------------------------------|
|  | PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO (ATA) A PARTIR DE VINAZAS RESIDUALES A ESCALA SEMIPILOTO | NUMERO: LAF-001-03 |
| | | PÁGINAS: 5 de 17 |
| | | FECHA DE EMISIÓN: 19/ABR/2018 |

- 5.5. Destilación por arrastre de vapor:** Proceso de separación de sustancias que componen una muestra mediante vaporización y condensación.
- 5.6. Rotaevaporador:** Equipo de destilación rotario asociado a un baño maría. Se basa en la separación (solvente-soluto) por media reducción de la presión atmosférica, evaporación y condensación.
- 5.7. Matriz o biomasa de ATA (Ácido Trans-aconítico):** Cantidad de Ácido Trans-aconítico obtenida al final de todo el proceso de extracción y tratamiento de la muestra. Esta requiere un proceso adicional de purificación para el ATA, teniendo en cuenta qué en este todavía hay presencia de otros ácidos orgánicos.


6. MATERIALES Y EQUIPOS

6.1. ELEMENTOS DE HIGIENE Y SEGURIDAD PERSONAL

Utilizar los siguientes elementos de protección personal:

- 6.1.1. Bata de laboratorio antifluido (por debajo de las rodillas)
- 6.1.2. Pantalón largo
- 6.1.3. Guantes de nitrilo
- 6.1.4. Guantes de látex para uso industrial
- 6.1.5. Guantes y delantal de camaza (para manipulación del equipo o recipientes cuando estos están en contacto con altas temperaturas)
- 6.1.6. Gafas de seguridad
- 6.1.7. Tapabocas y/o máscara full face
- 6.1.8. Calzado cerrado con suela antideslizante.

6.2. REQUERIMIENTOS DE OPERACIÓN

| | | |
|---|--|----------------------------------|
|  | PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO (ATA) A PARTIR DE VINAZAS RESIDUALES A ESCALA SEMIPILOTO | NUMERO: LAF-001-03 |
| | | PÁGINAS: 6 de 17 |
| | | FECHA DE EMISIÓN: 19/ABR/2018 |

- 6.2.1. Verificar existencia y modo de uso de juego de llaves de tuercas
- 6.2.2. Diligenciar formatos para registro de manejo del equipo

6.3. MATERIALES

- 6.3.1. Erlenmeyer de 2000 y 5000 mL
- 6.3.2. Probetas de 1000 mL y 5000mL
- 6.3.3. Embudos grandes de plástico
- 6.3.4. Cubetas plásticas
- 6.3.5. Frasco lavador
- 6.3.6. Papel parafilm
- 6.3.7. Trapeador y paños de limpieza

6.4. REACTIVOS

- 6.4.1. Vinaza proveniente del Ingenio Manuelita, acidificada a pH 2,00 con ácido sulfúrico
- 6.4.2. Acetato de Etilo

6.5. EQUIPOS

- 6.5.1. Planta de extracción semipiloto
- 6.5.2. Bécula de aproximadamente 300 Kg
- 6.5.3. Rotaevaporador

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

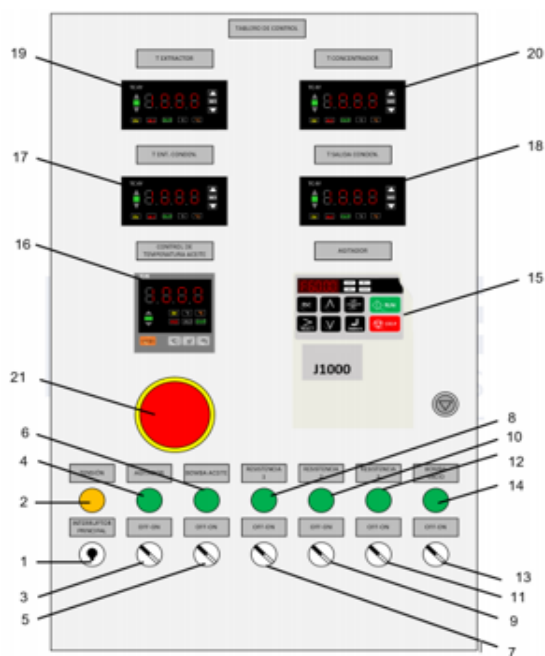


Figura 4. Panel de control de operación.

Tabla 1. Componentes del panel de control de operación presentados en la Figura 4.

| Nº | Nombre |
|----|--|
| 1 | Interruptor principal |
| 2 | Bombillo testigo encendido del sistema |
| 3 | Encendido agitador |
| 4 | Bombillo testigo agitador |
| 5 | Encendido bomba aceite |
| 6 | Bombillo testigo bomba aceite |
| 7 | Encendido resistencia 1 |
| 8 | Bombillo testigo resistencia 1 |
| 9 | Encendido resistencia 2 |
| 10 | Bombillo testigo resistencia 2 |
| 11 | Encendido resistencia 3 |
| 12 | Bombillo testigo resistencia 3 |
| 13 | Encendido bomba vacío |
| 14 | Bombillo testigo bomba de vacío |
| 15 | Variador de velocidad del agitador |
| 16 | Controlador temperatura aceite térmico |
| 17 | Temperatura entrada condensador |
| 18 | Temperatura salida condensador |
| 19 | Temperatura extractor |
| 20 | Temperatura concentrador |
| 21 | Botón Parada de emergencia |

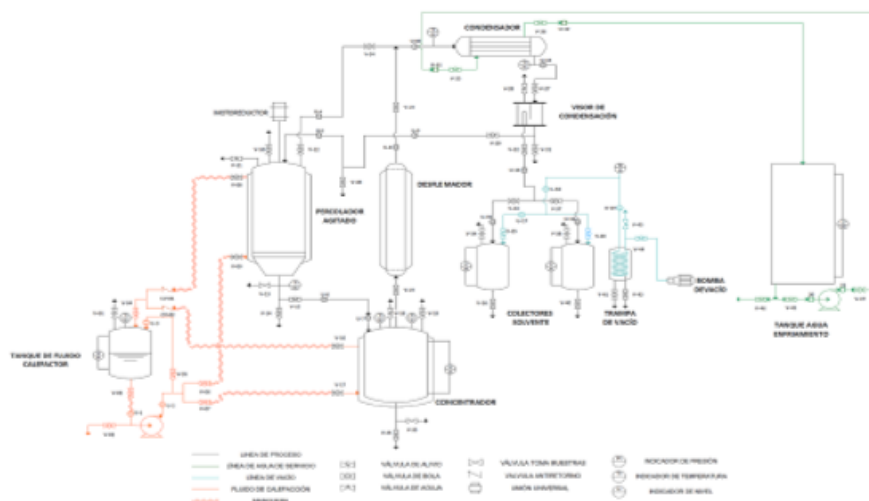


Figura 5. Esquema general de planta de extracción semi-piloto. (Cruz & Villegas, 2017)

7.1. ADECUACIÓN DE LA PLANTA DE EXTRACCIÓN

7.1.1. Verificar que tanques y válvulas se encuentren limpios y sin bloqueos que impidan su funcionamiento.

7.1.2. Se debe asegurar que las termocuplas se encuentren conectadas.

7.2. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO

7.2.1. EXTRACCIÓN EN LA PLANTA SEMIPILOTO

7.2.1.1. CARGA DEL SISTEMA:

1. Empleando las probetas de 1000 mL y 5000 mL, medir la cantidad suficiente de Vinaza y solvente Acetato de Etilo para obtener una relación másica de 1:5 (vinaza: solvente).
2. Obtenida la medición pivotar el tanque percolador en un ángulo de 45° e introducir, en primer lugar, la muestra de vinaza al tanque percolador de forma directa, y en segundo lugar el solvente.
3. Acoplar a la tapa del tanque percolador el aspa de agitación grande.
4. Desbloquear el soporte pivotante y fijar el tanque percolador en posición vertical.
5. Ajustar la tapa al tanque con la abrazadera, teniendo en cuenta que el empaque quede correctamente ubicado.
6. Acoplar el motor del agitador al eje de agitación de la tapa.
7. Verificar que las válvulas de drenaje (V-14) y (V-15), válvula de carga (V-10) y alivio (V-11) se encuentren cerradas.

7.2.1.2. CONDICIONES DEL PANEL DE CONTROL:

1. Abrir tablero del panel de control, subir interruptor, cerrar y encender el panel de control girando la perilla del interruptor principal.
2. Encender el motor del agitador y regular la velocidad de agitación a 95.00 Hertz (142.5 RPM).

3. El panel controlador se debe encontrar aproximadamente con las siguientes condiciones:

| Parámetro | Ajuste |
|-------------------------------------|-------------|
| Temperatura del extractor | N/A |
| Temperatura del concentrador | N/A |
| Temperatura entrada del condensador | N/A |
| Temperatura salida del condensador | N/A |
| Control de temperatura del aceite | N/A |
| Agitador | 95.00 Hertz |

7.2.1.3. PARADA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

1. Pasadas las (3) tres horas de extracción (agitación), detener la agitación oprimiendo la tecla stop del panel de control y apagar girando la perilla del agitador.

7.2.1.4. RECOLECCIÓN DE LAS FASES

1. Para recolectar las fases obtenidas, se debe ubicar dos o tres erlenmeyer de 5000 mL en la boquilla de la válvula (V-14), abrir la válvula, permitir el llenado y cerrar de nuevo.

NOTA:

- En este paso se recolectan dos (extractos) fases obtenidas de la extracción: en orden de salida, la primera es la fase acuosa y la segunda la fase orgánica.

- Se debe realizar la recolección de las dos fases teniendo en cuenta las diferencias de coloración de éstas, es decir, la primera fase en salir es la fase acuosa y esta presenta una coloración marrón y consistencia viscosa, se debe recolectar dicha fase en el primer erlenmeyer ubicado bajo la boquilla. Tan pronto como se vaya observando el cambio en coloración del extracto obtenido, cambiar de erlenmeyer con el fin de recolectar la fase orgánica, la cual presenta una coloración naranja y poca viscosidad. En las Figuras 3 y 4, respectivamente para la fase acuosa y orgánica se puede distinguir la diferencia de éstas en cuanto a su coloración.
- Se debe medir la cantidad de volumen recolectada de las dos fases, empleando las probetas de 1000 mL y 5000 mL, con el fin de asegurar trazabilidad.
- La fase acuosa obtenida y previamente medida será enviada al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad ICESI, para que sea empleada como precursores de la digestión anaeróbica.
- La fase orgánica obtenida y previamente medida recibirá el tratamiento descrito a continuación.

7.2.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

7.2.2.1. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (FASE ORGÁNICA) Y RECUPERACIÓN DEL SOLVENTE

Una vez recolectada la fase orgánica donde se encuentra el compuesto de interés (ATA), es necesario concentrar dicha muestra y recuperar el solvente utilizado (Acetato de Etilo), para tal fin se deben seguir los pasos descritos a continuación:

1. Garantizar el flujo de agua de refrigeración, para lo cual se debe verificar el contenido de agua en el tanque (reservorio de agua de enfriamiento), y el correcto funcionamiento de su bomba. Abrir las válvulas (V-25) y (V-26). (Si durante el proceso se interrumpe la entrada de agua, se debe suspender inmediatamente la operación).
2. Verificar que el nivel de aceite en el tanque calefactor este al 70% de su capacidad y permitir la recirculación del aceite abrir las válvulas (V-03) y (V-05), y cerrar las válvulas (V-06) y (V-07).
3. Para ajustar las condiciones en el Panel de control, encender las perillas: Interruptor principal, Bomba de aceite, resistencia 1 y resistencia 2.
4. Ajustar la temperatura de operación en el Panel de control de la bamba de aceite a 93°C.

5. Mientras se alcanza la temperatura de 93°C, introducir la muestra (fase orgánica) en el concentrador por medio de los alivios (V-19) o (V-18), con ayuda del ebudo grande de plástico.

NOTA:

- En este paso se debe asegurar que la válvula (V-21 inferior) se encuentre cerrada, puesto que de lo contrario la muestra introducida en el concentrador saldrá por dicha válvula.
- Una vez introducida la muestra asegurar que las válvulas (V-19) y (V-18) se encuentren cerradas.

6. Asegurar uniones universales (U-4), (U-5) y (U-6).
7. Verificar que las válvulas (V-28), (V-29), (V-20) y (V-31 visor) se encuentren cerradas y las válvulas (V-21 superior), (V-23), (V-27) y (V-32) estén abiertas.
8. Abrir las válvulas (V-32) y (V-33) para el tanque colector izquierdo o (V-32) y (V-37) para el tanque colector derecho.
9. Una vez se alcance la temperatura de 93°C en el tanque de fluido calefactor abrir válvula (V-07) y cerrar válvula (V-05) para permitir el paso del fluido calefactor al concentrador.
10. Revisar en el Panel de control que la temperatura del concentrador se encuentre en 70°C, para permitir la destilación por arrastre de vapor del Acetato de Etilo.
11. Revisar en el Panel de control que la temperatura de salida del condensador no sea mayor a 32°C.

NOTA:

- En el Panel de control se debe encontrar aproximadamente con las siguientes condiciones:

| Parámetro | Ajuste |
|-------------------------------------|--------|
| Temperatura del extractor | 28 °C |
| Temperatura del concentrador | 73 °C |
| Temperatura entrada del condensador | 71 °C |
| Temperatura salida del condensador | 25°C |
| Control de temperatura del aceite | 93°C |
| Agitador | N/A |

- Alcanzar las condiciones anteriormente descritas puede tardar aproximadamente (1) una hora una vez se de el paso del fluido calefactor al concentrador.
- El seguimiento de esta operación se debe realizar una vez se observe acumulación de condensado en el visor.

12. Una vez termine el proceso de destilación y por medio del visor no se observen gotas del destilado, apagar en el Panel de control las resistencias 1 y 2.
13. Cerrar válvula (V-07) y abrir válvula (V-05) para permitir la recirculación del aceite.

NOTA:

- Permitir que la bomba de aceite continúe la recirculación del aceite hasta disminuir la temperatura del sistema.

14. Suspender la circulación del aceite girando la perilla bomba de aceite en el panel de control (tanque de fluido calefactor) y apagar la bomba de recirculación de aceite.
15. Apagar interruptor principal, girando la perilla.
16. Abrir el tablero del Panel de control y bajar interruptor.
17. Apagar la bomba del tanque de agua de enfriamiento.

7.2.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRA CONCENTRADA Y SOLVENTE



PELIGRO POR IRRITACIÓN CUTÁNEA

PRECAUCIÓN:

Para la recolección del extracto concentrado y del solvente, se debe dejar enfriar el sistema totalmente.

- Una vez este totalmente frío el sistema, abrir válvulas de alivio del concentrador (V-19) y (V-18).
- Ubicar por debajo de válvula (V-21 inferior) un erlenmeyer de 5000 mL para permitir el vaciamiento del tanque concentrador de la muestra (fase orgánica concentrada).
- Terminada la recolección medir el volumen obtenido de la muestra concentrada empleando las probetas de 1000 mL y 5000 mL.
- Abrir alivios (V-34) para colector derecho o (V-38) para el colector izquierdo.
- Ubicar debajo de la válvula (V- 38) para colector derecho o (V-40) para colector izquierdo, un erlenmeyer de 5000 mL.
- Abrir la válvula (V-38) para colector derecho o (V-40) para colector izquierdo, para recolectar el solvente recuperado.
- Terminado la recolección cerrar alivios (V-34) o (V-38) y la válvula V-38) para colector derecho o (V-40) para colector izquierdo, respectivamente.
- Medir la cantidad de solvente recuperado empleando las probetas de 1000 mL y 5000 mL.

NOTA:

- El solvente recuperado obtenido en este paso, será empleado en futuras extracciones.

7.2.2.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE LA FASE ORGÁNICA CONCENTRADA

- En un balón para rotaevaporador de 1000 mL, adicionar aproximadamente 500mL de la cantidad colectada del extracto.
- Rotaevaporar el contenido y recuperar el solvente (Acetato de Etilo) para emplearlo en futuras extracciones.

Condiciones aproximadas del rotaevaporador:

| Parámetro | Ajuste |
|---------------------|----------|
| Vacío | 245 mbar |
| Rotación | 130 rpm |
| Temperatura de baño | 40°C |

(Repetir el proceso para toda la cantidad recolectada).

- Asegurar que la muestra este totalmente seca.

NOTA:

- Si la muestra no se observa totalmente seca, ajustar el rotaevaporador en las siguientes condiciones para eliminar el agua que la muestra pueda contener.

Condiciones aproximadas del rotaevaporador:

| Parámetro | Ajuste |
|---------------------|----------|
| Vacío | 180 mbar |
| Rotación | 180 rpm |
| Temperatura de baño | 60°C |

- Transvasar muestra seca contenida en el balón a un beaker previamente pesado, si es necesario agucionar gotas de agua tipo I, para realizar este paso.
- Reportar la cantidad en gramos de la muestra seca contenida en el beaker, esta será llamada matriz o biomasa que contiene el Ácido Trans-aconítico (ATA).
- Rotular y guardar adecuadamente.


NOTA:

- Esto con el fin de permitir que posteriores proyectos investigativos realicen la purificación del Ácido Trans-aconítico (ATA).

8. RECOMENDACIONES

Para la realización de la presente extracción es necesario tener en cuenta:

- Usar todo el equipo de seguridad durante la operación de la planta.
- Para manipular las muestras se debe usar guantes de nitrilo, si es necesario usar doble guante para evitar posibles molestias o irritaciones.
- No sobrepasar las cantidades especificadas, respecto a la relación másica especificada.

| | | |
|---|--|----------------------------------|
|  | PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO TRANS-ACONÍTICO (ATA) A PARTIR DE VINAZAS RESIDUALES A ESCALA SEMIPILOTO | NUMERO: LAF-001-03 |
| | | PAGINAS: 17 de 17 |
| | | FECHA DE EMISION: 19/ABR/2018 |

- Las temperaturas del aceite evidenciadas en el tablero controlador no deben superar los valores especificados.

9. REFERENCIAS

- Cruz, K., & Villegas, N. (2017). *Protocolo de extracción de compuestos volátiles, oleoresinas, polares y medianamente polares presentes en la pasta de ají habanero empleando la planta de extracción semipiloto*. Santiago de Cali: Universidad ICESI.
- García, A., & Rojas, C. (2005). Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. *Tecnicaña*, 2-11.
- Malmay, G., Monteil, F., Molinier, J., Hanine, H., Conte, T., & Mourgues, J. (1995). Recovery of aconitic acid from simulated aqueous effluents of the sugar-cane industry through liquid-liquid extraction. *Biosource Technology*, 33-36.
- Muller, E. (2002). *Liquid-liquid Extraction*. Obtenido de <http://www.interscience.wiley.com>.
- Stryer, L., Berg, J., & Tymoczko, J. (2013). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté.
- Vásquez, E. (2014). *Síntesis y caracterización de un material polimérico a partir del ácido trans-aconítico*. Santiago de Cali: Universidad Icesi.