

Diseño de un reactor continuo para la hidrólisis de lactoalbúmina con agua subcrítica

Casajús, Agustín; Sandrini, Nicolás.



FCEFYN – ICTA, UNC

Director: Dr. Alexis Rafael Velez

Codirectora: Dra. Jesica Romina Mufari

Octubre 2018

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 HIDRÓLISIS SUBCRÍTICA	3
2.2 PROPIEDADES DE SISTEMAS ISOCÓRICOS OPERADOS EN CONDICIONES SUBCRÍTICAS. COMPORTAMIENTO P, V, T.	5
2.3 CROMATOGRAFÍA	7
2.4 REACTORES CONTINUOS E INTERCAMBIADORES	9
3. OBJETIVOS	15
4. INSTRUMENTACIÓN	16
4.1 INSTRUMENTACIÓN PARA LOS ENSAYOS ISOCÓRICOS Y CORRIDAS DEL REACTOR	16
4.2 INSTRUMENTACIÓN PARA LOS ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	17
5. METODOLOGÍA Y DESARROLLO	19
5.1 ENSAYOS ISOCÓRICOS	19
5.1.1 INTRODUCCIÓN	19
5.1.2 METODOLOGÍA	19
5.1.2.1 Determinación del volumen de la celda	20
5.1.2.2 Obtención de la curva P vs T	20
5.1.2.3 Limpieza	21
5.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	21
5.2.1 INTRODUCCIÓN	21
5.2.2 METODOLOGÍA	22
5.3 EQUIPO DE PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS A ESCALA PILOTO	22
5.3.1 INTRODUCCIÓN	22
5.3.2 DISEÑO	23
5.3.2.1 Precalentador	23
5.3.2.2 Reactor	24
5.3.2.3 Enfriador	26
5.3.3 ENSAYOS EN REACTOR PILOTO	28

5.3.3.1 Preparación de la alimentación	28
5.3.3.2 Puesta en marcha	28
5.3.3.3 Obtención de hidrolizados	28
5.3.3.4 Limpieza	29
5.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DEL PRODUCTO DE REACTOR	29
6. RESULTADOS	30
6.1 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS EN LOS ENSAYOS ISOCÓRICOS	30
6.2 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS	33
6.3 DISEÑO DEL EQUIPO DE PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS	36
6.3.1 DISEÑO DEL PRECALENTADOR	36
6.3.2 DISEÑO DEL REACTOR	40
6.3.3 DISEÑO DEL ENFRIADOR	42
6.4 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DEL REACTOR	44
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROYECCIÓN DEL CRECIMIENTO DEL MERCADO DE AMINOÁCIDOS EN EL TIEMPO.....	1
FIGURA 2. ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL ENLACE PEPTÍDICO.....	4
FIGURA 3. COMPORTAMIENTO DE LAS ISOCORAS.....	6
FIGURA 4. VARIACIÓN DE LA DENSIDAD GLOBAL EN METANOL PURO.....	7
FIGURA 5. DIAGRAMA MOLECULAR DEL PRODUCTO DE DERIVATIZACIÓN.....	9
FIGURA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROLINA (IZQ.) Y SERINA (DER.).....	9
FIGURA 7. ESQUEMA DEL SISTEMA UTILIZADO PARA LOS ENSAYOS ISOCORICOS.....	19
FIGURA 8. ESQUEMA DEL EQUIPO UTILIZADO.....	23
FIGURA 9. COMPARACIÓN DE AGUA VS SUSPENSIÓN AL 3%.....	30
FIGURA 10. COMPARACIÓN DE AGUA VS SUSPENSIÓN AL 5%.....	30
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE AGUA VS SUSPENSIÓN AL 10%.....	31
FIGURA 12. COMPARACIÓN DE AGUA VS SUSPENSIÓN AL 15%.....	31
FIGURA 13. RELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE SÓLIDOS Y LA TEMPERATURA MÁXIMA ALCANZADA EN EL TRATAMIENTO.....	33
FIGURA 14. DEPENDENCIA EN LA RECUPERACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES CON LA TEMPERATURA.....	34
FIGURA 15. DEPENDENCIA DE LA RECUPERACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES TOTALES CON LA TEMPERATURA.....	34
FIGURA 16. RECUPERACIÓN DE AMINOÁCIDOS PARA ENSAYOS SELECCIONADOS.....	35
FIGURA 17. ESQUEMA NO A ESCALA DE LA LONGITUD DE REACTOR REQUERIDA PARA CADA TEMPERATURA.....	41
FIGURA 18. RECUPERACIÓN DE AMINOÁCIDOS A 200 °C.....	45
FIGURA 19. RECUPERACIÓN DE AMINOÁCIDOS A 235 °C.....	45
FIGURA 20. RECUPERACIÓN DE AMINOÁCIDOS A 270 °C.....	45
FIGURA 21. COMPARACIÓN DE TIEMPOS DE RESIDENCIA A 200 °C.....	47
FIGURA 22. COMPARACIÓN DE TIEMPOS DE RESIDENCIA A 235 °C.....	47
FIGURA 23. COMPARACIÓN DE TIEMPOS DE RESIDENCIA A 270 °C.....	48
FIGURA 24. COMPARACIÓN DE TEMPERATURAS PARA 30 MINUTOS DE RESIDENCIA.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. NOMENCLATURA DE LOS AMINOÁCIDOS.....	8
TABLA 2. DATOS RECOLECTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE VOLUMEN DE LA CELDA.....	20
TABLA 3. ENSAYOS REALIZADOS.....	21
TABLA 4. CÁLCULO DE CAUDAL DE FLUIDO REFRIGERANTE.....	27
TABLA 5. CORRIDAS REALIZADAS EN EL EQUIPO.....	29
TABLA 6. DIFERENCIA PORCENTUAL PROMEDIO ENTRE LA DENSIDAD DE AGUA PURA Y LA REAL UTILIZADA.....	32
TABLA 7. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE CALOR INTERNO.....	37
TABLA 8. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE CALOR EXTERNO.....	38
TABLA 9. CÁLCULO DEL ÁREA Y LARGO DEL INTERCAMBIADOR.....	39
TABLA 10. RESULTADOS DEL CÁLCULO ITERATIVO DEL LARGO.....	39
TABLA 11. CÁLCULO DE CONSTANTES CINÉTICAS PARA 200 °C.....	40
TABLA 12. CÁLCULOS DE TIEMPOS DE RESIDENCIA ÓPTIMOS.....	40
TABLA 13. CÁLCULO DEL VOLUMEN DEL REACTOR.....	41
TABLA 14. NÚMERO DE REYNOLDS PARA CADA ENSAYO REALIZADO.....	41
TABLA 15. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE CALOR EXTERNO.....	42
TABLA 16. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE CALOR INTERNO.....	43
TABLA 17. CÁLCULO DEL LARGO DEL ENFRIADOR.....	43
TABLA 18. RESULTADOS DEL CÁLCULO ITERATIVO DEL LARGO.....	43

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la producción y comercialización de aminoácidos ha cobrado gran importancia en muchas industrias a nivel mundial. La nueva generación de alimentos fortificados, dietas equilibradas y suplementos nutricionales abrió las puertas para una amplia gama de productos a base de hidrolizados de proteínas. Se espera que los precios y la disponibilidad de materia orgánica a bajo coste propongan un desafío de crecimiento a los actores industriales del rubro durante este período. Además, la creciente inversión en tecnología para el desarrollo de nuevos procesos, puede proveer grandes oportunidades para las compañías.

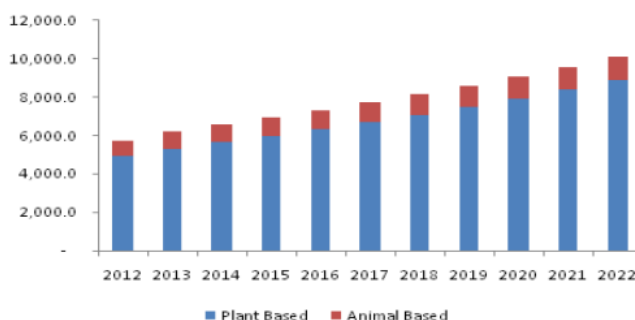


Figura 1. Proyección del crecimiento del mercado de aminoácidos en el tiempo.
Recuperado de *Amino Acids Market Size & Research Report, 2022* (2015).

Por otro lado, las políticas sobre desarrollo sustentable y el cuidado del medio ambiente, han forzado a las industrias a invertir tiempo y recursos en el tratamiento y aprovechamiento de sus efluentes. En Córdoba radican muchas industrias agropecuarias y alimenticias; algunas de ellas, particularmente las que utilizan leche o cereales como materias prima, suelen generar efluentes de alto contenido proteico, los cuales no solo carecen de valor comercial sino que además requieren tratamientos especiales para su deposición final.

De la situación planteada anteriormente, en la que grandes industrias están generando un efluente proteico potencialmente aprovechable, y un mercado demanda el consumo de derivados de la hidrólisis de estas proteínas a alto precio, surge un campo de investigación dedicado a la transformación fisicoquímica de este residuo en un producto de alto valor, como lo son los aminoácidos.

En el presente trabajo se hará especial énfasis en el procesamiento de α -lactoalbúmina, la principal proteína presente en el suero de leche bovina. El suero de la leche es un remanente líquido de la producción de quesos y yogures, y contiene sales disueltas, pequeñas cantidades de lactosa y hasta un 10% de proteínas globulares.

La operación principal en la transformación de un concentrado proteico en aminoácidos, es la hidrólisis. El objetivo de todo método de hidrólisis es la liberación cuantitativa de los

aminoácidos del sustrato, y la completa recuperación de estos en el hidrolizado. El hecho de que las reacciones de hidrólisis y la degradación de los residuos aminoacídicos se den en simultáneo, hace que la recuperación de los aminoácidos en el hidrolizado pierda eficiencia y el objetivo del método no llegue a cumplirse por completo.

Muchos factores afectan el rendimiento de la reacción de hidrólisis, entre ellos temperatura, densidad, tiempo, concentración de sustrato, agentes protectores (fenol, ácido tioglicólico, mercaptoetanol, indol, etc.), catalizadores y pH. La influencia de cada uno de ellos es analizada por ensayos a prueba y error. La combinación de dichos parámetros que permite obtener un mayor rendimiento en la liberación y recuperación de aminoácidos, deriva en los distintos métodos utilizados comúnmente en la industria: hidrólisis química (ácida o alcalina), enzimática y térmica.

Los métodos más tradicionales para la hidrólisis de proteínas son aquellos en los que se realiza un ataque químico al sustrato. La hidrólisis ácida con HCl es la más utilizada (Fountoulakis y Lahm, 1998). Las razones son: versatilidad en cuanto a la fase de aplicación del agente químico, sea líquida o gaseosa; facilidad de recuperación del mismo, ya que puede experimentar un cambio de fase líquido/gaseoso a bajas temperaturas. Las condiciones convencionales son 6 M HCl de 20 a 24 h a 110 °C y presiones cercanas al vacío. Por otro lado, la hidrólisis básica se utiliza casi exclusivamente para la determinación de triptófano, que es estable frente a condiciones alcalinas.

Al utilizar agentes ácidos se observa una gran efectividad en cuanto a la disociación de la cadena polipeptídica, pero se produce una importante pérdida de ciertos aminoácidos, generando a su vez productos de descomposición no deseados que pueden ser difícil de separar (Fountoulakis y Lahm, 1998; Sereewatthanawut et al., 2008).

Dichos problemas pueden ser evitados si se utilizan enzimas para catalizar la reacción. Sin embargo, la hidrólisis enzimática suele ser un proceso lento y sumamente costoso, particularmente por los altos precios de las enzimas que se utilizan. Sumado a esto, es necesario el uso de otros productos químicos como ácidos y bases, para garantizar que las enzimas actúen en condiciones óptimas (Sereewatthanawut et al., 2008).

La hidrólisis mediante agua sub o supercrítica es una alternativa atractiva. Se denomina como fluido supercrítico a toda sustancia sometida a condiciones de presión y temperatura superiores a las que definen su punto crítico, siendo para el agua 374 °C y 22,1 MPa. Al agua que es mantenida en estado líquido a temperaturas entre 100 y 374 °C se la denomina subcrítica o sobrecalentada. A los procesos de hidrólisis llevados a cabo con agua sub y/o supercrítica se los conoce como hidrotermólisis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hidrólisis subcrítica

Se denomina hidrólisis al proceso de escisión de una molécula mediante el agregado de una molécula de agua (o una parte de ella al menos). Dependiendo de las características del sustrato y más fuertemente del medio, puede ocurrir un ataque ácido o básico. En el ataque ácido, el primer paso es dado por un protón o un hidronio, el cual apunta a un área electronegativa de la molécula sustrato. Si el ácido tiene la suficiente fuerza, puede comenzar la reacción de hidrólisis al unirse a un determinado sitio (adición electrofílica). Por otro lado, al hablar de hidrólisis básica, se hace referencia al ataque realizado por oxhidrilos hacia un área con menor densidad electrónica de la molécula sustrato (adición nucleofílica).

El agua por sí misma presenta una actividad hidrolítica considerable, como ha sido reportado por distintos autores (Ramachandraiaha et al., 2017; Prado et al., 2016; Brunner, 2009; etc.) trabajando con distintos sustratos a temperaturas que van desde los 150 hasta los 300 °C, aumentando esta actividad a medida que aumenta la temperatura.

La razón por la cual el agua puede ser utilizada como medio para la hidrólisis sin necesidad de variar el pH inicial, subyace en la variación de sus propiedades físico químicas con la temperatura. Al aproximarse al punto crítico del agua, la conductividad térmica, la constante dieléctrica, el momento dipolar, la viscosidad y la densidad disminuyen con el aumento de la temperatura; por otro lado, la difusividad se ve favorecida a mayores temperaturas y el producto iónico aumenta en 3 órdenes de magnitud, hasta un máximo cerca de los 300 °C (Marshall & Franck, 1981; Katritzky, 1996). La capacidad calorífica del agua también se ve afectada con la presión y la temperatura, presentando máximos a condiciones determinadas. Muchos de estos fenómenos tienen origen en las variaciones que sufren los puentes hidrógeno entre moléculas en función de la temperatura. Por ejemplo, al calentarse el agua, parte de la energía que absorbe es utilizada para romper algunos de los puentes hidrógeno, por lo que se requiere aún más energía para aumentar su temperatura. Sumado a esto, el agua se vuelve comprensible en las regiones sub y supercríticas (Brunner, 2014), lo cual es una característica que ha de tenerse en cuenta para el diseño y operación de equipos que trabajen a tales condiciones. El comportamiento P-V-T del agua pura se discute más en profundidad en la sección 2.2.

La modificación de dichas propiedades da lugar a una serie de fenómenos interesantes, como lo es la importante actividad hidrolítica que sitúa a la hidrotermólisis como un competidor para los métodos alternativos de procesamiento de biopolímeros. Particularmente, el incremento en el producto iónico (es decir, el aumento en la concentración de iones H⁺ y OH⁻) favorece mecanismos de reacción que implican un ataque ácido/base a la cadena polimérica, lo cual significa que el agua actúa como catalizador y como reactante (Brunner,

2009). Esta característica, también contribuye fuertemente a la efectividad, versatilidad y sencillez del método.

Particularmente para el caso de hidrólisis de proteínas, dada la complejidad y variabilidad del enlace peptídico, el uso de agua como catalizador y reactante es una alternativa favorable. Esto se explica por el hecho que al poder llevar a cabo la reacción por medio de adición nucleofílica y electrofílica, el agua tiene un alcance mayor que aquellos catalizadores ácido o básico por separados.

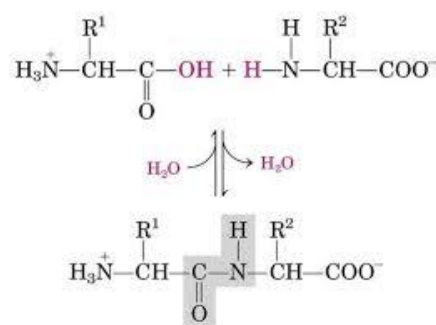


Figura 2. Esquema de la reacción de hidrólisis del enlace peptídico.

Además, algunos aminoácidos se destruyen debido a ataques ácidos o básicos muy severos. En la hidrólisis ácida, se produce la destrucción de los residuos de triptófano, cisteína y metionina y puede producirse la desaminación de serina y treonina, además, la asparagina y la glutamina se convierten a sus derivados ácidos, a saber, ácido aspártico y glutámico (Llames y Fontaine, 1994; Flores, Caballero y Moreira, 2008). En cuanto a la básica o alcalina, hay destrucción de serina, treonina, arginina y cisteína (Flores, Caballero y Moreira, 2008). Incluso se han reportado casos en los que la hidrólisis con agua subcrítica ha dado mejores rendimientos de aminoácidos libres que la hidrólisis ácida (Sereewatthanawut et al., 2008).

Por otro lado, desde un punto de vista ambiental, la utilización de agua sub o supercrítica es una alternativa más favorable que los métodos hidrólisis ácida y básica. No se generan residuos sólidos causados por la neutralización del exceso de reactivos, y se evita la utilización de sustancias inflamables, explosivas, corrosivas o tóxicas. Si bien se genera algo de corrosión en los equipos, este resulta mucho menor que el que se observa al utilizar catalizadores ácidos (Lin et al., 2015). La hidrólisis enzimática evita estos problemas, pero se requieren tiempos operativos extensos y las enzimas son a menudo difíciles de recuperar. Sumado a esto, para el caso de hidrólisis de proteínas, debido a la alta complejidad de los diversos enlaces peptídicos, es necesaria la utilización de más de una enzima, ocasionalmente acompañadas de un pretratamiento de la alimentación (Hill y Schmidt, 1962). A su vez, la utilización de agua como solvente, catalizador y reactante deriva en menores costos en materiales que los demás métodos discutidos, siendo el gasto energético requerido el de mayor ponderación.

Los procesos de hidrólisis subcrítica han demostrado además una gran versatilidad operativa. En numerosas ocasiones se ha utilizado esta tecnología para procesar biopolímeros de diversas naturalezas, siendo los polisacáridos y los polipéptidos, tanto de origen vegetal como animal, los principales grupos de interés. Algunas de las estructuras en cuestión son: quitina (Yang et al., 2018), celulosa (Cocero et al., 2018; Cantero et al., 2013; Prado et al., 2016; Lin et al., 2015), albúmina de suero bovino (Rogalinski et al., 2008; Brunner, 2009) y mezclas contenidas en matrices más complejas, por ejemplo provenientes de desechos de las industrias pesqueras y agrícolas (Ruiz et al., 2013). Además, se puede ajustar la selectividad y el rendimiento obtenidos al variar condiciones operativas como temperatura y tiempo de residencia. Para el caso de tratamiento de proteínas, a mayores temperaturas de operación, el máximo rendimiento de aminoácidos libres se obtiene a menores tiempos de residencia. Por otro lado, se genera una mayor destrucción de aminoácidos al aumentar la severidad del tratamiento, esto es, someter la alimentación a mayores temperaturas durante más tiempo (Rogalinski et al., 2008). No todos los aminoácidos tienen la misma capacidad de soportar altas temperaturas. Se ha observado que los aminoácidos que primero se descomponen al aumentar la temperatura son ácido glutámico y cisteína, seguidos por ácido aspártico, y por treonina y arginina a temperaturas un poco mayores (Abdelmoez et al., 2007; Espinoza et al., 2012). En el otro extremo, se ha reportado que glicina y valina son los que más resisten a temperaturas superiores (Abdelmoez et al., 2007). Los residuos de descomposición de los aminoácidos son muy variados. Se ha propuesto que hay dos principales mecanismos de reacción que ocurren en simultáneo: la desaminación, que forma ácidos orgánicos y amoníaco y la descarboxilación, formando ácido fórmico y amidas (Rogalinski et al., 2005). Procesos de descomposición más profundos pueden generar otros compuestos, a saber alcoholes de pocas unidades de carbono, aldehídos, aminas y gases como CO, CO₂, H₂ y CH₄ (Brunner, 2014; Espinoza, 2011). Además, se han observado otros tipos de reacciones paralelas a determinadas condiciones, como lo son la polimerización de glicina (Brunner, 2014), la formación de valina y prolina a partir de lisina y arginina respectivamente y la descomposición de treonina, asparagina y serina para dar glicina y/o alanina (Espinoza, 2011; Andersson & Holm, 2000; Abdelmoez et al., 2007).

2.2 Propiedades de sistemas isocóricos operados en condiciones subcríticas. Comportamiento P, V, T.

Como ya se ha mencionado, dentro del rango de parámetros que corresponde a la región de fluido subcrítico, las propiedades físicas y químicas del agua varían drásticamente. Dentro de ellas, una de las más determinantes durante la operación de un sistema es la densidad:

La importancia de conocer la densidad dentro del reactor radica en el hecho de que la densidad de la mezcla reaccionante determina el tiempo de residencia en el reactor. Debido a que la densidad es un factor altamente sensible respecto de la temperatura y la presión en regiones cercanas a la crítica, la determinación de esta variable se torna en un trabajo crítico para asegurar un apropiado control de operación del reactor.

Para trabajar con un valor de densidad confiable, es necesario asegurar la existencia de una única fase dentro del sistema. Esto se debe a que haya dos (o más) fases, la densidad no va a ser constante en todo el volumen del reactor, y se obtendría como resultado solo un promedio de las densidades de las fases. Llevar el control directo de las condiciones de fases cuando las reacciones son llevadas a cabo en condiciones extremas de presión y temperatura puede resultar una técnica dificultosa, por lo que es conveniente utilizar algún método indirecto que indique la transición del sistema desde un estado de equilibrio líquido vapor (L-V) hacia una condición de fase homogénea. Dentro de este tipo de métodos indirectos existen varias alternativas que son propuestas en la literatura, entre los cuales se destacan aquellos en los que se monitorean propiedades físicas del sistema (Velez, 2012).

La presión es una propiedad física fácil de monitorear al trabajar con fluidos subcríticos, normalmente dejando el volumen constante y siendo la temperatura la variable dependiente. Al evaluar los sistemas de esta forma, se observa que las curvas de equilibrio de fases llegan a un punto de inflexión, en el cual la pendiente cambia abruptamente. Este quiebre es la representación gráfica del punto en el cual dejan de coexistir dos fases (una líquida y otra gaseosa), para dar lugar a una única fase, que puede ser líquida o gaseosa. A partir de este punto, se puede decir que se está en presencia de un fluido subcrítico.

En la figura 3 se puede ver la tendencia que siguen las curvas isocóricas cuando atraviesan el punto de transición de fases, desde una zona bifásica a monofásica:

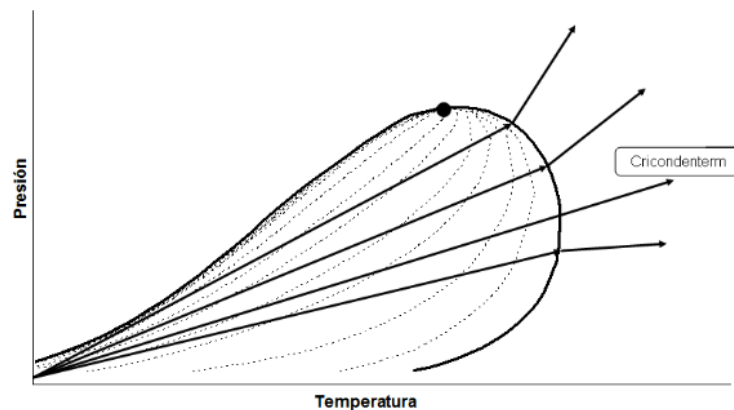


Figura 3. Comportamiento de las isocoras. Recuperado de *Ingeniería del Equilibrio entre Fases de Procesos de Producción de Biodiesel* (Velez, 2012).

Se conoce como cricondentem a la máxima temperatura a la que puede existir líquido en un sistema bifásico, sin importar la presión. Y cricondenbar, a la máxima presión a la que puede existir gas en un sistema bifásico (Velez, 2012). Por otro lado, el punto crítico es aquel punto en el que la curva del punto de rocío y la curva del punto de burbuja se juntan, y las condiciones de presión y temperatura para ambas fases son las mismas, lo que las hace indistinguibles.

El quiebre de pendiente observado en la figura 3 se puede visualizar en el comportamiento de todo sistema bifásico. La figura 4 es un ejemplo a lo explicado anteriormente, tomando como sustancia de trabajo al metanol en fases líquida y vapor:

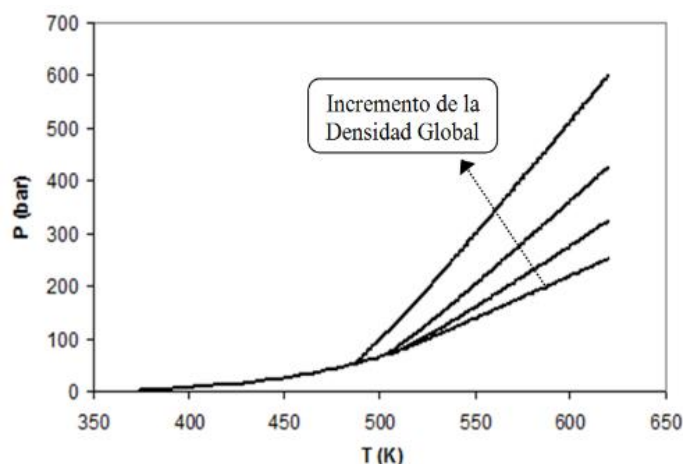


Figura 4. Variación de la densidad global en metanol puro. Recuperado de *Ingeniería del Equilibrio entre Fases de Procesos de Producción de Biodiesel* (Velez, 2012).

Como se puede ver, el valor de la presión y temperatura en el punto de transición de fases depende de la densidad global. Es decir, la temperatura correspondiente al punto de burbuja es menor a medida que se aumenta la masa del sistema, manteniendo el volumen constante. Esto implica que la fase homogénea se alcance más rápido.

El hecho de trabajar con una suspensión proteica y no con agua pura supone una dificultad extra: la mezcla puede presentar un comportamiento muy distante al del agua. Si se tiene en cuenta la poca (prácticamente nula) disponibilidad de datos termodinámicos para suspensiones de lactoalbúmina en agua a condiciones subcríticas, lo anteriormente planteado se convierte en un problema. Gran parte de los autores que han trabajado con suspensiones proteicas en condiciones subcríticas omiten por completo este problema; otros tan solo suponen que los datos del agua pura pueden ser usados como aproximación para sus sistemas, aunque ninguno de ellos da pruebas fehacientes de que tal suposición no conlleve grados de error considerables.

2.3 Cromatografía

La cromatografía es un método que se basa en la separación de sustancias en función del tiempo de retención de las mismas al atravesar una columna empacada. A medida que cada componente sale de la columna atraviesa un detector, el cual los cuantifica devolviendo como resultado un valor proporcional a la cantidad de sustancia, que luego se plasma en un cromatograma permitiendo su identificación.

El tiempo de retención de cada analito en una columna cromatográfica depende de su interacción con la misma. Existen columnas que separan por tamaño, adsorción, solubilidad, susceptibilidad para el intercambio iónico, tamaño/carga, afinidad. Para la separación de

aminoácidos se utiliza una técnica denominada cromatografía en fase reversa, donde la columna está compuesta por cadenas de hidrocarburos de un largo determinado que interaccionan más fuertemente con aquellas moléculas de menor polaridad.

En cuanto a la detección, también existen diversos métodos utilizados: absorción en UV-visible, infrarrojo, fluorescencia, índice de refracción, dispersión de luz, métodos electroquímicos, conductividad, y de masas. Dentro de ellos, el UV-visible es uno de los más utilizados, de gran versatilidad, muy preciso y relativo bajo coste.

Los aminoácidos no absorben energía por sí mismos en el rango del UV-Vis, por lo tanto requieren una reacción previa a la detección, denominada derivatización. El término derivatización describe una técnica utilizada en química que consiste en transformar un compuesto químico en un producto que posee una estructura química similar, llamado derivatizado o derivativo. Por lo general, se aprovecha un grupo funcional específico del compuesto parental en la reacción de derivatización transformando el analito en un derivado que posee una reactividad química, solubilidad, polaridad, o en este caso, absorbe energía a longitudes de onda diferentes a las originales.

Un reactivo que se utiliza comúnmente para este fin es el etoximetilenmalonato de dietilo. Entre las ventajas que presenta este compuesto se pueden mencionar que lleva a cabo una reacción sencilla, rápida, cuantitativa y reproducible, y se consigue a bajo costo (Mufari, 2011).

El etoximetilenmalonato de dietilo reacciona con los aminoácidos produciendo derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil]. El derivado de prolina es diferente en comparación con los demás aminoácidos, debido a que su grupo amino forma parte de un ciclo y no se encuentra libre para unirse al derivatizante de la misma manera. Como consecuencia de esto, la prolina es difícilmente cuantificable mediante este método. Los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] formados son estables por varias semanas a temperatura ambiente (Alaiz et al., 1989). Estos derivados no sólo proveen la interacción necesaria con la fase estacionaria apolar, sino que además poseen una alta absorbancia en la región UV para su sencilla detección espectrofotométrica a 280 nm. Otra cualidad notable de este reactivo es la ausencia del pico de reactivo en el cromatograma, ya que el mismo posee su máxima absorbancia a otra longitud de onda (240 nm), lo que evita la necesidad de eliminar el exceso de reactivo derivatizador.

Ac. Aspartico	D
Ac. Glutamico	E
Serina	S
Histidina	H
Glicina	G
Treonina	T
Arginina	R
Alanina	A
Prolina	P
Tirosina	Y
Valina	V
Metionina	M
Cisteína	C
Isoleucina	I
Leucina	L
Fenilalanina	F
Lisina	K

Tabla 1. Nomenclatura de los aminoácidos.

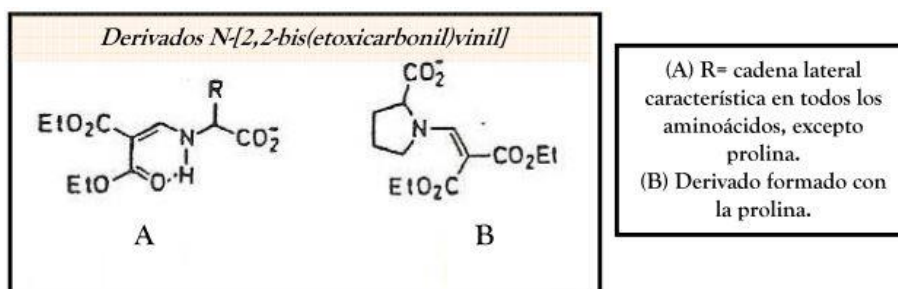


Figura 5. Diagrama molecular del producto de derivatización. Recuperado de *Determinación y cuantificación de proteínas solubles y de aminoácidos totales en harina de Quinoa* (Mufari, 2011).

La cuantificación de los aminoácidos se lleva a cabo utilizando curvas de calibración, las cuales permiten convertir los valores en unidades de área bajo la curva (arrojados por el software del equipo) en valores de concentración. En el trabajo de la Dra. Mufari de 2011 se presentan curvas para varios de los aminoácidos más comunes. Todos ellos tienen curvas lineales y con muy poca variación, excepto la prolina, cuya curva presenta una gran linealidad aunque con importantes desvíos. Esto incrementa el error en las determinaciones de este aminoácido, sobre todo a bajas concentraciones donde el desvío es mayor. Otra desventaja que tiene el método propuesto es que no permite la identificación y cuantificación de asparagina, glutamina y triptófano.

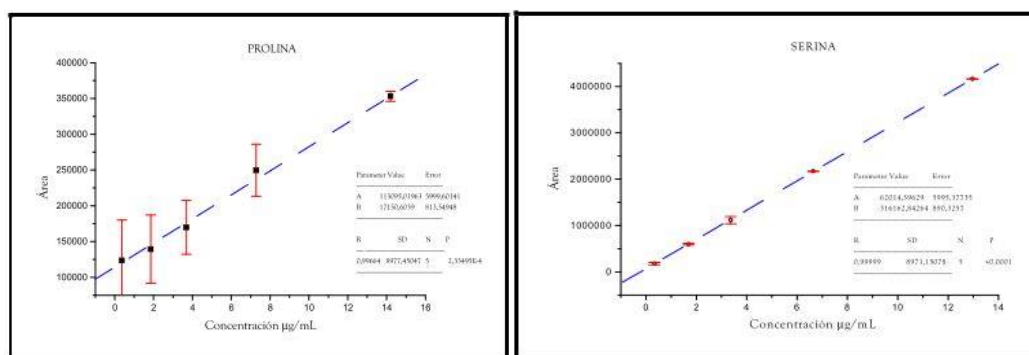


Figura 6. Curva de calibración para prolina (izq.) y serina (der.). Recuperado de *Determinación y cuantificación de proteínas solubles y de aminoácidos totales en harina de Quinoa* (Mufari, 2011).

2.4 Reactores continuos e intercambiadores

Reactores continuos

Los reactores son equipos especialmente diseñados para llevar a cabo reacciones químicas de manera controlada. Estos se pueden clasificar según su modo de operación en continuos, semicontinuos y discontinuos. Para la elección de un tipo específico de reactor deben tenerse en

cuenta diversos factores, que van desde el volumen de producción deseado, hasta las condiciones operativas puntuales que se requieren, pasando por el tipo de substrato a utilizar y la reacción (o reacciones) a la que éste será sometido.

El reactor continuo por excelencia es el Flujo Pistón (RFP). Este consta esencialmente de un tubo de cierto diámetro, a través del cual fluye la mezcla reactiva, de manera que hay un ingreso y un egreso constante de materia. Idealmente, en cada diferencial de su recorrido se tiene una misma velocidad de reacción y por lo tanto una misma concentración (una vez que el equipo se encuentra en estado estacionario). Para aproximarse a esta idealización, es importante que se mantenga un estado de flujo turbulento en todo momento a lo largo del reactor. El tiempo de residencia (τ) en este tipo de reactor está dado por el tiempo que tarda un diferencial de masa en atravesar todo el volumen (o longitud) del mismo. Si se compara con un reactor de mezcla completa (RMC), el RFP presenta las siguientes ventajas (Fogler, 2008; Levenspiel, 2004):

- En reacciones en serie, para cualquier conversión se obtiene un mejor rendimiento que en un RMC
- Mayor conversión de reactivos que el RMC para volúmenes iguales
- Menor variabilidad en los resultados. Al trabajar en continuo, el producto es más homogéneo. En un RMC puede variar de lote a lote.
- Menores tiempos muertos, y mayor productividad. A bajos tiempos de residencia, los tiempos muertos del RMC pueden significar un elevado porcentaje del tiempo de operación.
- Permite controlar la temperatura con un horno eléctrico. Con el RMC sería más difícil prescindir de la camisa calefactora
- Fácil mantenimiento en su operación
- Mayor simplicidad de instalación (para los recursos disponibles)
- Mayor aprovechamiento de calor. Se evita la pérdida de calor producida en los tiempos muertos del RMC
- Permite obtener conversiones más altas

Además, si se lo compara con un reactor continuo de mezcla completa (RCMC) bajo las mismas condiciones operativas, se evidencia que para alcanzar una determinada conversión el reactor flujo en pistón requiere volúmenes considerablemente menores¹. Esto se debe a que el RCMC siempre funciona a la velocidad de reacción más baja, dado que como se supone mezcla completa, las condiciones de la corriente de salida como concentración de reactivo y producto, son las mismas que en todo el volumen del reactor. Por otro lado, el RFP comienza trabajando a alta velocidad (alta concentración de reactivo), la cual disminuye gradualmente hasta el extremo opuesto del mismo.

Para diseñar cualquier tipo de reactor, es necesario plantear las ecuaciones que lo definen. Si se considera el balance molar de una especie determinada i , se puede plantear lo siguiente:

¹ Esto se cumple generalmente cuando se trata de una reacción isotérmica de orden mayor a cero.

$$(Entrada\ de\ i) - (Salida\ de\ i) + (Generación\ de\ i) = (Acumulación\ de\ i)$$

Y en términos de flujo molar:

$$F_{i|V} - F_{i|V+\Delta V} + r_i\Delta V = 0 \quad (1)$$

Dividiendo por ΔV y reacomodando, se obtiene:

$$\frac{F_{i|V+\Delta V} - F_{i|V}}{\Delta V} = r_i \quad (2)$$

Luego, si se toma límite haciendo que ΔV tienda a cero:

$$\lim_{\Delta V \rightarrow 0} \left[\frac{F_{i|V+\Delta V} - F_{i|V}}{\Delta V} \right] = \frac{dF_i}{dV} \quad (3)$$

Entonces, la ecuación diferencial para el balance molar en estado estacionario de un RFP es:

$$\frac{dF_i}{dV} = r_i \quad (4)$$

La ecuación 4 es la expresión general que se tiene para un RFP, la cual debe ser ajustada para cada reacción particular que se quiera llevar a cabo; en otras palabras, debe considerarse la cinética de reacción. Para el caso de la hidrólisis de albúmina, se puede considerar un modelo simplificado que consta de dos reacciones consecutivas². La primera es la de la escisión del enlace peptídico y la segunda es la que corresponde a la descomposición térmica de los aminoácidos, ambas de carácter irreversible.



Siendo A lactoalbúmina, B aminoácidos libres y C productos de descomposición de los mismos. Varios autores proponen que ambas reacciones responden a cinéticas de primer orden (Rogalinski et al., 2005; Rogalinski et al., 2008; Brunner, 2014; Espinoza, 2011). La velocidad a la cual se desarrolla cada reacción depende de la temperatura, observándose que las constantes cinéticas se modelan con la ecuación de Arrhenius (Rogalinski et al., 2008). Más adelante, se hará énfasis en el desarrollo de las expresiones que definen este tipo de reacciones³.

Intercambiadores

El diseño de los intercambiadores de calor también va a variar en base al tipo de intercambiador en cuestión. Estos pueden clasificarse según su configuración (de placas, de

² Para este análisis no se toman en consideración otras reacciones paralelas y de polimerización, dado que es de interés la formación de aminoácidos.

³ Ver sección 5.3.2.2.

tubos y coraza, etc.) o según los fluidos que participan del intercambio calórico (agua, vapor, hidrocarburos, aire, etc.). También se debe tener en cuenta si el equipo va a ser utilizado para calentar o para enfriar una determinada corriente.

Sea cual sea el equipo que se va a utilizar, para su diseño es necesario conocer qué cantidad de calor ha de ser transferida, y cuáles son los mecanismos con los que se lleva a cabo dicha transferencia. El coeficiente global de transferencia de calor U permite realizar un cálculo unificado considerando en qué medida el calor es transferido mediante conducción, convección y radiación. El coeficiente global va a depender entonces de los distintos coeficientes particulares que se tengan, los cuales a su vez se definen en base a las condiciones de los fluidos que participan en el intercambio calórico, a saber: temperatura, velocidad, viscosidad, capacidad calorífica, conductividad térmica, densidad, difusividad térmica y coeficiente de expansión volumétrica. Dichas propiedades se relacionan entre sí mediante números adimensionales, los cuales son indispensables a la hora de diseñar este tipo de equipos.

Los números adimensionales que serán utilizados para el diseño de los intercambiadores de calor son:

- Número de Reynolds (Re):

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (6)$$

Se define como la relación entre las fuerzas convectivas y las fuerzas viscosas de un fluido y sirve para caracterizar el movimiento del mismo. Si el Re es mayor a 2300 se tiene un sistema con flujo turbulento, si es menor a este valor predomina el flujo laminar.

- Número de Prandtl (Pr):

$$Pr = \frac{Cp\mu}{k} \quad (7)$$

Se define como la relación entre la viscosidad y la difusividad térmica de un fluido. Valores pequeños de este número representan una alta velocidad de difusión de calor respecto a la velocidad del fluido.

- Número de Rayleigh (Ra):

$$Ra = \frac{g\beta}{\nu\alpha} (T_s - T_\infty)Lc^3 \quad (8)$$

Se define como la relación entre las fuerzas que promueven la transferencia de calor por convección y las que se le oponen. Se dice que a valores menores a 10000 la transferencia de calor se da fundamentalmente por conducción.

- Número de Nusselt (Nu):

$$Nu = \frac{hLc}{k} \quad (9)$$

Se define como la relación entre la transferencia de calor por convección y por conducción que se da entre un fluido y una superficie. Si toma valores superiores a 1, predomina la convección, si es menor a 1 tiene más importancia la conducción.

Siendo:

- ❖ ρ la densidad del fluido
- ❖ v la velocidad del fluido
- ❖ D el diámetro interior de la tubería por donde fluye el fluido
- ❖ μ la viscosidad dinámica del fluido
- ❖ Cp la capacidad calorífica del fluido
- ❖ k la conductividad térmica del fluido
- ❖ g la aceleración de la gravedad
- ❖ β el coeficiente volumétrico de expansión térmica del fluido
- ❖ α la difusividad térmica del fluido
- ❖ T_s la temperatura de la superficie
- ❖ T_∞ la temperatura del fluido lejos de la superficie
- ❖ Lc una longitud característica
- ❖ h el coeficiente de transferencia de calor por convección

Existen distintas correlaciones para calcular el número de Nusselt, dependiendo de la naturaleza del sistema, de manera que se pueden calcular los valores correspondientes de los coeficientes de transferencia por convección. Con todos esos datos se puede calcular el coeficiente global de transferencia de calor. Si se considera el caso de un fluido circulando por el interior de un tubo cilíndrico, el cual está inmerso en otro fluido:

$$\frac{1}{U p} = \frac{1}{h_i 2\pi r_i} + \frac{\ln\left(\frac{r_e}{r_i}\right)}{2\pi k} + \frac{1}{h_e 2\pi r_e} \quad (10)$$

Donde:

- ❖ U es el coeficiente global de transferencia de calor
- ❖ p es el perímetro del tubo por donde fluye el fluido a calentar o enfriar
- ❖ h_i es el coeficiente de convección para el fluido en el interior del tubo
- ❖ r_i es el radio interno del tubo
- ❖ h_e es el coeficiente de convección para el fluido en el exterior del tubo
- ❖ r_e es el radio externo del tubo
- ❖ k es la conductividad térmica del material del tubo

Considerando despreciable la transferencia de calor por radiación.

A la hora de diseñar un intercambiador de calor, es muy importante conocer las condiciones a las que se quiere que trabaje, dado que las propiedades de los fluidos involucrados pueden variar con la temperatura del sistema (y en algunos casos también con la presión). Es necesario tener en cuenta que al trabajar con agua subcrítica pueden surgir ciertas complicaciones. La transferencia de calor desde el tubo hacia el agua que circula por su interior

puede verse entorpecida por la aparición de burbujas de vapor en la pared del mismo. En el peor de los casos es posible la formación de una película aislante, disminuyendo fuertemente la capacidad de transferencia de calor real del equipo. A este fenómeno se lo denomina crisis de transferencia de calor, y puede verse favorecido en sistemas con flujo pulsante. Sin embargo, se espera que al trabajar a presiones superiores a los 100 bares⁴ este problema pueda ser evitado. Además se ha reportado que al trabajar con intercambiadores en forma de espiral se puede mejorar significativamente el intercambio de calor a condiciones cercanas al punto crítico del agua (Brunner, 2014).

⁴ Presión suficiente para mantener agua en estado líquido hasta temperaturas de 311 °C

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar un reactor continuo escala piloto para la hidrólisis de lactoalbumina con agua subcrítica.

Objetivos específicos

→ Evaluar experimentalmente las propiedades volumétricas del sistema reactivo en las condiciones de operación para un correcto cálculo del tiempo de residencia.

→ Construir un reactor continuo tubular a escala planta piloto que permita realizar la reacción a elevada temperatura y presión.

→ Encontrar condiciones de hidrólisis subcríticas que permitan obtener hidrolizados con alto porcentaje de aminoácidos libres.

→ Evaluar la concentración de aminoácidos libres obtenidos con diferentes parámetros de operación.

4. INSTRUMENTACIÓN

4.1 Instrumentación para los ensayos isocóricos y corridas del reactor

- Celda de acero inoxidable

La reacción fue llevada a cabo dentro de una celda de acero inoxidable de construcción propia. Se empleó acero bajo la norma AISI 316, el alto contenido de cromo y níquel le otorga una excelente resistencia a la corrosión, y la estructura cristalina, sumado al hecho de que las piezas no tienen costuras, hacen que este material sea capaz de soportar muy altas presiones. Se utilizó un tubo de 1/2 pulgada de diámetro, dos reducciones de 1/2 a 1/4 de pulgada y una tapa removible de 1/4 para uno de sus extremos.

- Intercambiadores de calor y reactor

Para la construcción de estos equipos se utilizaron tubos del mismo acero mencionado, con diámetros de 1/8 plg para los intercambiadores, y de 1/4 para el reactor.

- Horno eléctrico

Se utilizó un horno eléctrico OLR SA con display digital para controlar la temperatura. Temperatura máxima 1200 °C.

- Horno de secado

Los análisis de sólidos totales se realizaron utilizando un horno MARNE, con temperatura máxima de 140 °C.

- Balanza analítica

Ohaus adventurer con límite de detección de 0,0001 g y máximo admisible de 210 g.

- Balanza

Una balanza Bumer de Systel SRL que soporta mayores pesos fue utilizada para la preparación de volúmenes de suspensión mayores, requeridos por el reactor continuo.

- Agitador magnético

Para preparar la suspensión de lactoalbúmina se utilizó un agitador magnético calefaccionado DLab MS-H280-PRO.

- Termocupla

La señal tomada por la termocupla fue leída con un termómetro digital TES1300 tipo K.

- Sensor de presión

El sensor utilizado fue un Dynisco TPT463E-10M-6/18 y se procesó la señal con un indicador Dynisco UPR800-1-0-3.

- Bomba

Se hizo uso de una bomba de pistón proveniente de un HPLC, modelo Waters 501, con presiones operativas de hasta 200 bares, y capaz de generar flujos dentro de un rango de 0,1 a 9,9 g/min.

- Check valve

Esta pieza fue de vital importancia para el funcionamiento adecuado del equipo. Ante cualquier detención del sistema, la válvula impide que el fluido caliente del interior del reactor retroceda, dañando la bomba y poniendo en riesgo la seguridad de las personas a su alrededor.

- Válvula de presión

En el extremo posterior del sistema se colocó una válvula reguladora de presión Conflow capaz de soportar hasta 600 bares, con la cual se pudo operar el equipo a altas presiones, con una gran sensibilidad en el ajuste de la misma y de manera segura.

- Lactoalbúmina

Para los ensayos isobáricos se utilizó proteína de suero de leche de 99% de pureza, producida por Sigma Aldrich. Los ensayos en reactor continuo se llevaron a cabo con proteína al 80%, comercializada por Pura Química del grupo Todo Droga.

- Agua destilada

Obtenida por destilación simple en la planta piloto.

4.2 Instrumentación para los análisis cromatográficos

En esta etapa se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) y una serie de sustancias químicas para poder realizar la determinación de aminoácidos.

- HPLC

Equipo HPLC marca Perkin Elmer, con una bomba binaria Serie 200, Inyector Rheodyne 7725i, loop de 20 µL. Detector espectrofotométrico UV-visible Serie 200, Integrador Serie 600 y desgasificador al vacío Serie 200.

- Columna

La columna utilizada para los análisis de los ensayos isocóricos fue una Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm y tamaño de partícula de 5 µm) de Agilent Technologies®, mientras que para los análisis correspondientes a las muestras del reactor continuo, se utilizó una columna similar de 250 mm longitud.

- Software

El análisis de datos se realizó con el software Total Chrom Workstation versión 6.3 (Perkin Elmer).

- Reactivo derivatizante

Para derivatizar los aminoácidos se usó etoximetilmalonato de dietilo, de Fluka Analytical, Sigma Aldrich.

- Filtro

Filtro Captiva Premium Syringe, carcasa de polipropileno, membrana de nylon, diámetro 15 mm, 0.2 µm de diámetro de poro, marca Agilent.

- Solventes

Los solventes utilizados por el cromatógrafo fueron buffer acetato de sodio y acetonitrilo.

- Patrón

La identificación de los componentes se realizó en base a comparaciones mediante un patrón de aminoácidos AAS18 de Fluka Analytical, Sigma Aldrich®.

5. METODOLOGÍA Y DESARROLLO

5.1 Ensayos isocóricos

5.1.1 Introducción

En este proyecto, la propiedad monitoreada para detectar la transición de fases fue la presión. Si el volumen total de una celda de volumen constante puede medirse con exactitud, la transición de fases en el sistema es detectada mediante un cambio en la pendiente de la curva de presión vs temperatura.

Con los resultados de cada ensayo, se buscaron los valores de densidad de agua pura que más se asemejaban al comportamiento obtenido experimentalmente con la suspensión. Con el promedio de estos valores, se establecía la diferencia entre la densidad de trabajo y la del agua pura a dichas condiciones de P y T. Esto sirvió para justificar la posterior modelización del reactor continuo, utilizando la densidad del agua pura como la densidad de la mezcla.

El equipo utilizado se esquematiza en la figura 7:

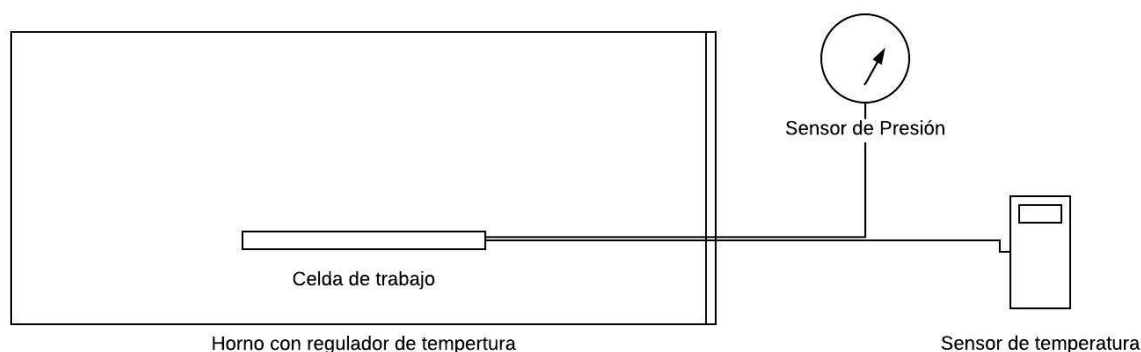


Figura 7. Esquema del sistema utilizado para los ensayos isocóricos.

El mismo consiste en una celda de volumen constante dentro de un horno, con un sensor de presión y temperatura dentro.

5.1.2 Metodología

La metodología consistió en inyectar una cantidad conocida de una suspensión de lactoalbúmina en agua en la celda de acero inoxidable, con un sensor de presión y temperatura dentro. Esta celda luego se colocaba dentro del horno, y se elevaba la temperatura a 160 °C por 2,5 h, para asegurar el equilibrio térmico y mecánico. Seguido a eso, estando aún en una zona de dos fases, se elevaba la temperatura unos grados por sobre el punto de transición de fases del agua pura para la densidad de trabajo, y se mantenía 1 h. Este punto ya se encuentra en la zona homogénea de fases, por lo que a partir de allí se trazó la curva P vs T, subiendo la temperatura 3 °C/30 min aprox., y anotando los parámetros del equilibrio a cada paso.

5.1.2.1 Determinación del volumen de la celda

El volumen de la celda se midió de manera indirecta, inyectando una masa conocida de agua en ella y luego estudiando su comportamiento PVT. La relación entre la presión y la temperatura en el equilibrio definió una densidad global, que se definía por el cociente de masa de agua inyectada/volumen de celda. A partir de allí se calculó el volumen de la celda:

Masa de agua destilada inyectada: 18,1777 g.

Hora	T (°C)	P (bar)	densidad NIST (g/mL)	Volumen (mL)
11:50	272	112	0,77202	23,5456
12:35	275	138	0,77055	23,5906
13:20	277	165	0,77084	23,5817
13:50	280	194	0,76973	23,6157

Tabla 2. Datos recolectados para la determinación de volumen de la celda.

Siendo el volumen promedio obtenido de **23,5834 ml**.

5.1.2.2 Obtención de la curva P vs T

Una vez conocido con precisión el volumen de la celda, se procedió con los ensayos con lactoalbúmina. Para cada experimento a realizar, se definió una concentración inicial de proteína y una densidad global de trabajo. En base a esto se comenzó con la preparación de la suspensión.

En primer lugar se utilizó la balanza analítica para pesar la cantidad de proteína necesaria en un beaker y se completó con agua destilada hasta llegar a la masa deseada. Luego se agitaba la mezcla para garantizar una mejor suspensión del sólido, calentando a 50 °C. Para incorporar la suspensión a la celda se utilizó una jeringa. Con la tara de la misma, se cargaba la masa requerida de suspensión y se inyectaba en la celda. Posterior a la inyección se controla nuevamente la tara, manteniendo un error menor al 0,5% para así lograr valores precisos de densidad. Una vez asegurado este parámetro se cerraba la celda y se colocaba dentro del horno.

Cuando se llegaba a la región de una fase, la variación de la pendiente de curva P vs T se evidenciaba con bruscos aumentos de la presión por cada grado que se subía la temperatura. Una vez en esta región, las tasas de calentamiento fueron de 2 o 3 °C por vez. El tiempo de espera para que la presión alcance el equilibrio en fase homogénea, era aproximadamente 30 minutos. Con la T y P estables, se procedía a tomar nota de las variables e incrementar otros 3 °C la temperatura para buscar un nuevo punto de equilibrio. Usualmente se intentaba obtener 5 o 6 puntos por cada ensayo, trabajando hasta presiones no superiores a los 400 bares. Una vez finalizado el ensayo se dejaba enfriar la celda dentro del mismo horno y a temperatura ambiente. De esta manera, se aseguraba tener una baja velocidad de enfriamiento para no someter el material de la celda a tensiones excesivas. Una vez fría, se recolectaba el extracto para su posterior análisis y se procedía con la limpieza del equipo.

De esta manera se logró obtener la curva P vs T para la suspensión y se prosiguió a compararla con la curva del agua pura a esa misma densidad. Así se concluyeron 18 ensayos, evaluando 13 condiciones distintas de operación:

		Densidad (g/mL)				
		0,75	0,77	0,8	0,82	0,85
Concentración (lact./agua)	3%	✓	✓	✓	✓	✓
	5%	✓		✓	✓	✓
	10%			✓	✓	✓
	15%				✓	

Tabla 3. Ensayos realizados.

Esta densidad es de importancia en el modelado de los parámetros del reactor a la hora de definir el caudal másico. Las altas presiones y temperaturas de trabajo hacen que la densidad de la suspensión varíe una vez que ingresa al reactor. Por esta razón, resulta más seguro la utilización del caudal másico (calculado con la densidad del sistema) en lugar del volumétrico para definir las condiciones de operación.

5.1.2.3 Limpieza

Una vez recolectado el extracto, la celda era enjuagada repetidas veces intercalando el uso de alcohol etílico al 96% y agua destilada a temperatura ambiente. Luego de esto, se le inyectaban unos 18 ml de solución de etanol en agua al 50% y se la sometía a 200 °C y 200 bares aproximadamente durante 30 minutos. Por último, una vez fría, la celda era enjuagada nuevamente intercalando los solventes.

5.2 Análisis cromatográficos

5.2.1 Introducción

Los estudios realizados sobre los extractos congelados de los ensayos isocóricos se enfocaron en la determinación de aminoácidos libres, sin discriminar la naturaleza exacta de las demás especies obtenidas en cada experimento. Con la masa de sólidos totales se pudo determinar la cantidad porcentual de proteína perdida como gas o sólido precipitado, lo que sirve como parámetro de la severidad del tratamiento y la estabilidad de la estructura proteica en las condiciones trabajadas. La cantidad recuperada de sólidos no es estrictamente proporcional a la cantidad de aminoácidos obtenidos, ya que estos sólidos pueden ser tanto aminoácidos como péptidos o demás compuestos.

Los resultados obtenidos en estos ensayos, permitieron definir más adelante las condiciones de operación más favorables en el reactor continuo.

5.2.2 Metodología

Para evaluar el grado de hidrólisis obtenido se decidió llevar a cabo una técnica analítica desarrollada por la Dra. Romina Mufari, la cual se basa en una reacción química de derivatización de aminoácidos, seguida de una determinación mediante cromatografía líquida de alta presión. El equipo cuenta con un detector UV, que trabaja a una longitud de onda de 280 nm.

En primer lugar se debe tomar la muestra. Se decidió tomar 100 mg de cada extracto y colocarlos en tubos eppendorf. Estas muestras se secaron en un horno a 105 °C por 24 hs. Una vez secas, se les añadió con una pipeta automática 1 ml de buffer borato 1 M (pH 9) que contiene 0,02% de azida de sodio y 1,5 µl de etoximetilenmalonato de dietilo (derivatizante). Para asegurar la total homogeneidad se agitó con un vortex durante unos segundos cada muestra, luego fueron llevadas a un baño maría con control digital de temperatura a 50 °C durante 50 min para agilizar la reacción de derivatización. Una vez derivatizadas, se almacenaban a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

Previo a la inyección en el RP HPLC, la muestra se filtra utilizando filtros de 0,22 micras para proteger la columna del taponamiento. Para una determinación más eficiente, se utiliza un programa específico mediante el cual se regula el flujo de alimentación hacia la columna. Cada corrida tenía una duración de 25 min, tiempo suficiente para que todos los aminoácidos sean detectados.

Para conocer la concentración de los aminoácidos, se trabajó con las curvas de calibración desarrolladas por la Dra. Romina Mufari. Esta técnica permite cuantificar eficientemente 16 de los 20 aminoácidos canónicos, los cuales constituyen un 92% del total másico de la lactoalbúmina (Mufari, 2011).

Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.3 Equipo de procesamiento de proteínas a escala piloto

5.3.1 Introducción

Para el diseño del equipo, se utilizaron los resultados obtenidos en la primer etapa del proyecto para definir la concentración y temperatura de trabajo, y a partir de ello los instrumentos y materiales a emplear. Además, se tuvieron en cuenta las limitaciones técnicas-económicas dictadas por los plazos de tiempo manejados para la realización de la experiencia y la disponibilidad de equipos.

El sistema utilizado puede esquematizarse de la siguiente manera:

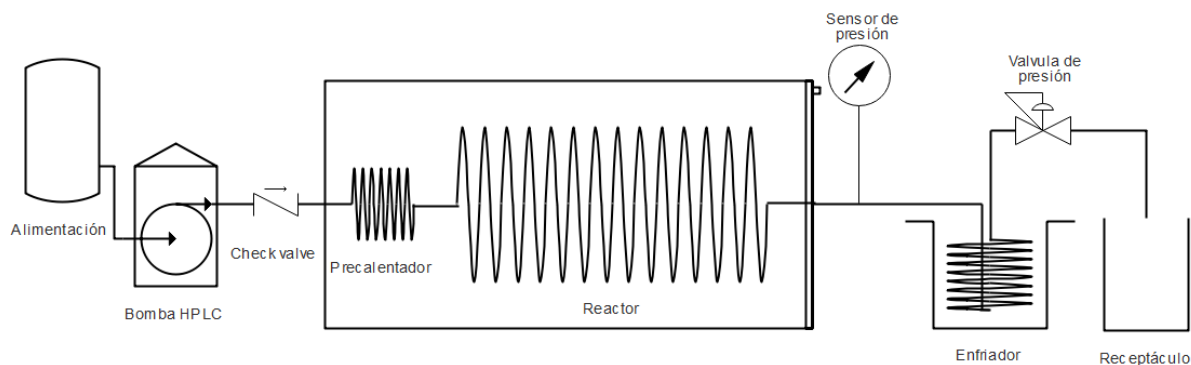


Figura 8. Esquema del equipo utilizado.

Las tres principales partes a diseñar del equipo son el precalentador, el reactor en sí mismo y el enfriador. A continuación se trata el diseño de cada una de ellas por separado.

5.3.2 Diseño

5.3.2.1 *Precalentador*

El primer intercambiador de calor tiene la función de calentar la mezcla de alimentación hasta la temperatura del reactor. Para realizar los primeros cálculos, se utilizaron los parámetros de operación que maximizan el requerimiento de transferencia de calor. Para la alimentación se tomaron temperaturas de 50 °C⁵ para la inicial y 268 °C para la final, dado que la máxima temperatura a la cual se decidió operar el reactor fue de 270 °C. Además, se consideró un flujo másico de 9,9 g/min, que es el máximo caudal que entrega la bomba. De esta manera, la cantidad de calor que el intercambiador debe transferir se encuentra en su máximo valor, lo cual permite realizar un diseño que asegure la operatividad del equipo en todo el rango de trabajo. Se debe tener en cuenta que cuando se trabaje con flujos o temperaturas menores a estas, el equipo va a estar un tanto sobredimensionado.

Además de los parámetros operativos, para realizar el diseño se requieren datos correspondientes al fluido calefactor, fluido a calentar y a la disposición del intercambiador en sí. Los datos de los fluidos se extrajeron de bibliografía, y en cuanto a la disposición del intercambiador, Hendricks (1970) manifiesta que al tratar con fluidos sub y supercríticos las configuraciones de calentadores en espiral resultan muy efectivas. Por esta razón y por cuestiones de simplicidad se eligió construir un intercambiador de un tubo de acero inoxidable de 1/8 plg de diámetro interno en espiral. Dadas las complicaciones que suponen calefaccionar un fluido hasta temperaturas muy superiores a los 100 °C, se decidió que el fluido calefactor debía ser aire, evitando de esta manera la utilización de otros fluidos particulares, de alto costo y potencial peligrosidad. El tubo metálico en forma de espiral se colocó entonces dentro de un

⁵ Temperatura a la cual se mezclan los componentes de la alimentación.

horno eléctrico, capaz de alcanzar temperaturas de hasta 1200 °C, mediante el cual se mantenía constante la temperatura del aire.

Para poder dimensionar el intercambiador, primero se calcularon los coeficientes de transferencia de calor por convección dentro y fuera del tubo, y luego a partir de ellos y la conductividad del acero se calculó el coeficiente global. Con el coeficiente global y la fórmula de enfriamiento de Newton, se despegó el área y así se obtuvo el largo del tubo.

5.3.2.2 Reactor

Con la información recabada en los ensayos isocóricos y apoyándose en la bibliografía, se tenía que construir un reactor que obtenga similares (o mejores) resultados a mayor escala. Para ello se procedió a identificar las variables de diseño, y evaluar la disponibilidad de recursos necesarios.

Gran parte del diseño del reactor es llegar a expresiones para el cálculo de su volumen y de su tiempo de residencia, las cuales van a depender del tipo de reacción (o reacciones) que se lleve a cabo. Como se planteó en el marco teórico, la hidrólisis de lactoalbúmina suele ser modelada como un sistema de reacciones de primer orden en serie (Ecuación 5). Para la primera reacción se pueden plantear las siguientes ecuaciones:

$$-r_A = k_1 C_A \quad (11)$$

$$\frac{-dF_A}{dV} = -r_A \quad (12)$$

Donde C_A representa la concentración molar de A y F_A es el flujo molar de A. Además, éste último se define como:

$$F_A = v_0 C_A \quad (13)$$

Siendo v_0 el flujo volumétrico. Al combinar estas ecuaciones se obtiene:

$$\frac{v_0 dC_A}{dV} = k_1 C_A \quad (14)$$

La solución de esta ecuación diferencial es:

$$C_A = C_{A0} e^{-k_1 \tau} \quad (15)$$

La expresión de la cinética para la especie B:

$$r_B = k_1 C_A - k_2 C_B \quad (16)$$

$$\frac{dF_B}{dV} = r_B \quad (17)$$

$$F_B = v_0 C_B \quad (18)$$

$$\frac{v_0 dC_B}{dV} = k_1 C_A - k_2 C_B \quad (19)$$

Y reemplazando la expresión anteriormente obtenida para C_A :

$$\frac{v_0 dC_B}{dV} = k_1 C_{A0} e^{-k_1 \tau} - k_2 C_B \quad (20)$$

A su vez, esta expresión se puede reescribir teniendo en cuenta la definición del tiempo de residencia (τ):

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (21)$$

$$\frac{dC_B}{d\tau} = k_1 C_{A0} e^{-k_1 \tau} - k_2 C_B \quad (22)$$

Al resolver esta ecuación diferencial se obtiene una expresión de la concentración de aminoácidos libres (C_b) en función del tiempo de residencia. Para hacer esto, se puede emplear el siguiente factor de integración:

$$\frac{dy}{dt} + k_2 y = k_1 e^{-k_1 \tau} \quad (23)$$

Siguiendo el desarrollo, se puede llegar a la expresión final para calcular la concentración de aminoácidos libres totales en un RFP para un sistema de dos reacciones consecutivas:

$$C_B = C_{A0} \frac{k_1}{k_2 - k_1} [e^{-k_1 \tau} - e^{-k_2 \tau}] \quad (24)$$

Esta expresión es válida siempre que se trabaje bajo los supuestos de que el sistema es isotérmico, que el flujo volumétrico es constante, y que se tiene reacciones de primer orden. Para diseñar el reactor, interesa saber que volumen y que tiempo de residencia maximizan la concentración de aminoácidos libres, por lo tanto se buscarán los máximos de la ecuación planteada derivándola e igualándola a cero:

$$\frac{dC_B}{d\tau} = 0 \quad (25)$$

De esta manera, se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$\tau = \frac{1}{k_1 - k_2} \ln \frac{k_1}{k_2} \quad (26)$$

$$V = \frac{v_0}{k_1 - k_2} \ln \frac{k_1}{k_2} \quad (27)$$

Entonces, tan solo con conocer las constantes de las reacciones planteadas anteriormente y definiendo un caudal volumétrico, se pueden calcular los valores del volumen y tiempo de

residencia óptimos. Como las constantes de velocidad varían con la temperatura, se encontrará un tiempo de residencia óptimo para cada una de las tres temperaturas de trabajo. Los datos utilizados para los ensayos a 235 °C y 270 °C fueron extraídos del trabajo de Rogalinski et al. del 2008. Para los ensayos a 200 °C se utilizó la ecuación de Arrhenius linealizada:

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (28)$$

En función de la energía de activación (E_a) y el factor pre exponencial (k_0) calculados por Rogalinski et al. en el mismo trabajo, para despejar la constante de velocidad.

5.3.2.3 Enfriador

La alimentación del enfriador es la mezcla proteica que se obtiene como producto en el reactor. Esta mezcla ingresa a nuestro enfriador a temperaturas entre 200 y 270 °C, y la función de este equipo es extraer el calor necesario para disminuir esta temperatura hasta al menos 50 °C, ya que la válvula de presión ubicada al final del sistema tiene una membrana de goma que no resiste temperaturas elevadas.

El equipo, al igual que el precalentador, consta de un tubo de acero inoxidable de 1/8 plg de diámetro interno dispuesto en espiral, sumergido en un recipiente adiabático contenedor del fluido frío. Como fluido frío se utilizó agua, el refrigerante por excelencia, ya que es económico y accesible, no presenta toxicidad y tiene un calor específico y conductividad térmica elevadas. El caudal de agua requerido se calcula en función de la temperatura final alcanzada por la misma, y a partir del caudal y la temperatura a la que llega la mezcla proteica del reactor. Para los cálculos, al igual que con el precalentador, se utilizan las condiciones de mayor exigencia para el equipo, para así asegurar siempre el correcto funcionamiento. El peor de los casos es aquel en el que se trabaja con altos caudales y temperaturas de la mezcla proteica, ya que ambos parámetros aumentan la cantidad de calor a extraer.

En cuanto al caudal de agua, como el equipo utilizado no cuenta con ingreso/egreso de fluido constante, se representa con la frecuencia con la que se renueva el volumen del recipiente con agua a 0 °C. La lógica que se siguió para calcular esta frecuencia es:

- Definir un volumen para el equipo, y el porcentaje de este ocupado por hielo
- Encontrar qué capacidad de extracción de calor tiene esta cantidad de agua fijando una temperatura máxima, 10 °C en este caso
- Con ello, calcular qué masa de fluido caliente a la máxima temperatura es posible enfriar hasta la temperatura deseada (50 °C)
- Con la masa y el caudal máximo utilizado, calcular qué tiempo le toma a esta cantidad de fluido caliente atravesar el enfriador
- Este tiempo es el que indica la frecuencia con la que se debe renovar el volumen de agua fría del equipo

$\Delta H_{f,F}$	kJ/kg	3,34
$m_{F(\text{hielo})}$	kg	0,5
$m_{F(\text{agua})}$	kg	1
$T_{F,i}$	°C	-18
$T_{F,o}$	°C	0
$T_{F,f}$	°C	10
$Cp_{F(\text{hielo})}$	kJ/kg°C	2,09
$Cp_{F(\text{agua})}$	kJ/kg°C	4,18
Q	kJ	62,31
$T_{C,i}$	°C	270
$T_{C,f}$	°C	20
m_C	kg	0,0596
\dot{m}_C	kg/min	0,01
t	min	6

Tabla 4. Cálculo de caudal de fluido refrigerante.

Con:

$$Q = m_{F(\text{hielo})} * Cp_{F(\text{hielo})} * (T_{F,o} - T_{F,i}) + \Delta H_{f,F} * m_{F(\text{hielo})} + m_{F(\text{agua})} * Cp_{F(\text{agua})} * (T_{F,f} - T_{F,o}) \quad (29)$$

$$-Q = m_C * Cp_C * (T_{C,i} - T_{C,f}) \quad (30)$$

$$\dot{m}_C = m_C/t \quad (31)$$

Siendo Q el calor a intercambiar, $\Delta H_{f,F}$ la entalpía de fusión del hielo, $T_{F,o}$ la temperatura de fusión, \dot{m}_C el máximo caudal másico del producto del reactor y correspondiendo el subíndice “F” al fluido frío compuesto por agua y hielo, “C” al fluido caliente, “i” para las condiciones iniciales y “f” para las finales.

El resultado indica que a fin de extraer el calor de la corriente proveniente del reactor con las condiciones más adversas, se debe renovar la totalidad del volumen de agua cada 6 minutos. Como en estas condiciones (10 g/min y 270 °C) el ensayo dura sólo 10 min, solo se requiere 1 cambio de volumen. Para aquellos ensayos a menor caudal o temperatura, el cambio de refrigerante se efectúa con menos frecuencia. En todos los casos, se aseguró que el agua refrigerante no supere los 10 °C en su superficie.

Para mantener el agua a 0 °C, se tuvo que tener en cuenta que a la hora de renovar el fluido frío haya un 50% del volumen total ocupado por hielo, ya que el equilibrio sólido-líquido del agua se da a 0 °C. El hielo era extraído de un freezer a -18 °C.

Para el recipiente contenedor se utilizó un pote de helado de 1 kg de poliestireno expandido, ya que tiene el tamaño adecuado y presenta bajos valores de conductividad

térmica, que van desde 0,033 W/m°C hasta 0,057 W/m°C a 0 °C, dependiendo de su densidad. Con estas variables de diseño definidas, fue posible calcular el largo del intercambiador siguiendo la misma metodología utilizada para el cálculo del precalentador.

5.3.3 Ensayos en reactor piloto

5.3.3.1 Preparación de la alimentación

La preparación de la alimentación se realizó según la metodología explicada para los ensayos isocóricos, con la diferencia de que en este caso se necesitaba un volumen mayor para cada corrida. Previo a la transferencia desde el beaker al recipiente de alimentación, la suspensión se calentaba hasta unos 50 °C, para asegurar que no presente heterogeneidades. La homogeneidad de la suspensión es un aspecto preponderante a tener en cuenta para el cuidado de la bomba, dado que estas partículas sólidas pueden ingresar a los pistones y atascar o dañar el sistema.

5.3.3.2 Puesta en marcha

La puesta en marcha del equipo comenzaba una vez que se tenía el volumen de alimentación requerido para cada corrida. En todos los casos se encendía primero la bomba permitiendo que entre la alimentación al sistema y se iba aumentando progresivamente el caudal hasta llegar al objetivo. Luego se encendía el horno configurándolo a la temperatura de trabajo definida para cada ensayo en particular. En paralelo al aumento de la temperatura proporcionado por las resistencias del horno, se iba ajustando la válvula de presión, controlando que ésta no supere la presión de trabajo de 120 bares.

5.3.3.3 Obtención de hidrolizados

Con el equipo en marcha, la suspensión comienza a tomar contacto con las condiciones de reacción, generando los primeros hidrolizados. La muestra de cada ensayo debe ser tomada luego de que el reactor alcanzó el estado estacionario, y para esto se deja correr el sistema un tiempo equivalente a 3 tiempos de residencia. Una vez transcurrido este tiempo, se recolectaba la muestra en un tubo falcon que luego se llevaba a refrigeración para su posterior análisis cromatográfico y se concluía la corrida.

En el reactor continuo se evaluaron 4 tiempos de residencia para 3 temperaturas distintas, manteniendo en todos los casos una presión de 120 bares, suficiente como para garantizar el estado de una fase dentro del sistema para todas las temperaturas de operación.

		Tiempo de residencia (min)			
		10	15	30	60
Temperatura (°C)	200	✓	✓	✓	✓
	235	✓	✓	✓	✓
	270	✓	✓	✓	✓

Tabla 5. Corridas realizadas en el equipo.

5.3.3.4 Limpieza

Para realizar la limpieza del reactor, se alimentaba agua destilada a un caudal de 9,9 g/min, manteniendo una temperatura de 270 °C. En estas condiciones se hacía circular un volumen mínimo equivalente a 6 volúmenes de reactor. En caso de no ser suficiente, se continuaba con la limpieza hasta obtener un extracto más limpio. Este procedimiento era realizado al final de cada día. Una vez apagado el equipo, se lo dejaba en reposo lleno de agua y a presión moderada.

5.4 Análisis cromatográficos del producto de reactor

Al igual que con los extractos de los ensayos isocóricos, los extractos del producto del reactor fueron descongelados, luego muestreados (100 mg), secados y derivatizados, solo que en este caso se utilizaron menores volúmenes de buffer y reactivo.

En el afán de aumentar el área de los picos generados por el cromatógrafo, se duplicó la concentración de la muestra, diluyéndose las muestras secas con la mitad del volumen de buffer utilizado para los ensayos isocóricos. Como la concentración utilizada del derivatizante es 1,5 µl por cada 1 ml de buffer, esta vez se debía utilizar 0,75 µl. Teniendo en cuenta que el exceso de derivatizante no es problema y que la pipeta utilizada es de volumen mínimo 1 µL, se utilizó este volumen.

El HPLC requiere que las muestras sean filtradas antes de la inyección. Por ello se procedió a filtrar el contenido de cada eppendorf con un filtro Captiva Syringe con membrana de Nylon de 0,2 µm de diámetro de poro, de la marca Agilent.

Las corridas esta vez se llevaban a cabo en una columna de 25 cm, más larga que la anterior de 15 cm, por lo que los tiempos se extendieron. Cada muestra demoraba 45 min en atravesar la columna, obteniéndose por ende cromatogramas con picos más separados, permitiendo una mejor precisión para la integración de las áreas.

Los ensayos se realizaron por duplicado.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de los parámetros termodinámicos en los ensayos isocóricos

Los resultados se muestran agrupados en las distintas concentraciones iniciales ensayadas. Cada grupo de datos se presenta junto con aquellos correspondientes al agua pura (datos extraídos del NIST), representadas en los gráficos P vs T como líneas punteadas. En estos gráficos, cada rama representa una densidad distinta:

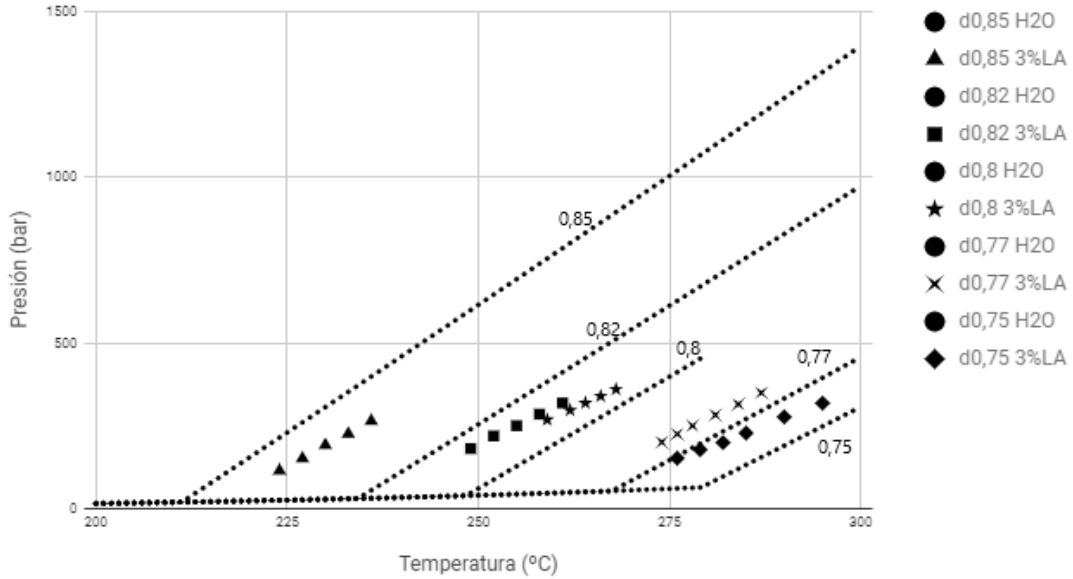


Figura 9. Comparación de agua vs suspensión al 3%. Las líneas punteadas representan valores para el agua pura (extraídos de NIST).

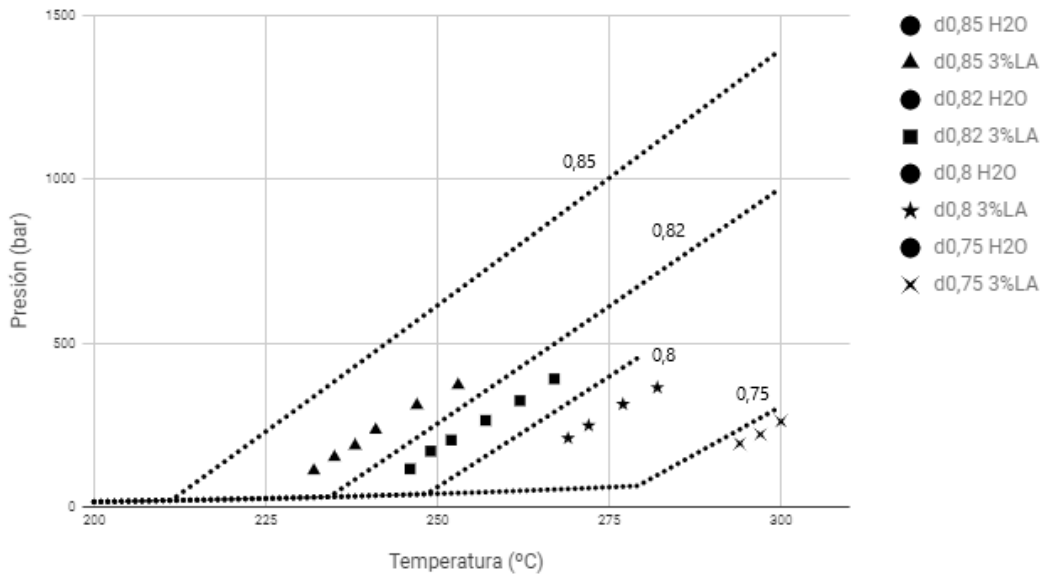


Figura 10. Comparación de agua vs suspensión al 5%. Las líneas punteadas representan valores para el agua pura (extraídos de NIST).

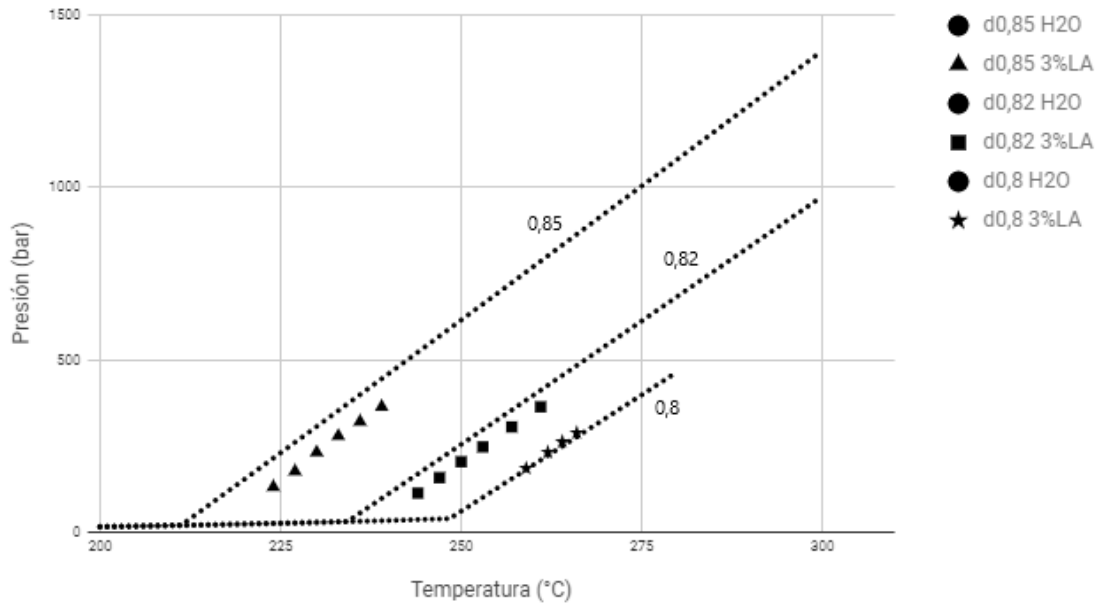


Figura 11. Comparación de agua vs suspensión al 10%. Las líneas punteadas representan valores para el agua pura (extraídos de NIST).

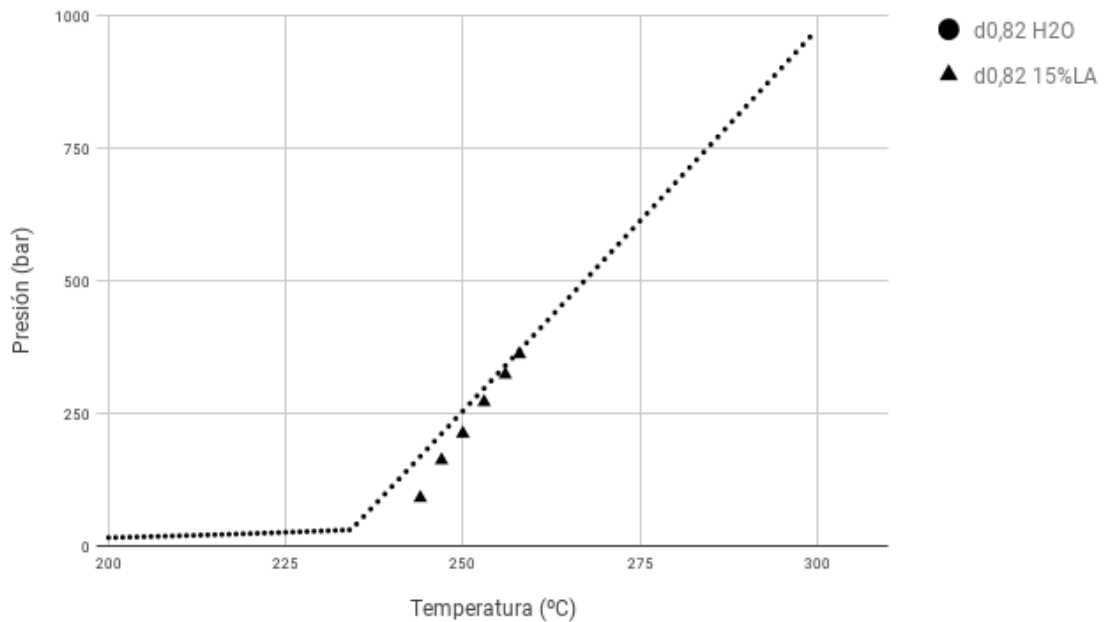


Figura 12. Comparación de agua vs suspensión al 15%. Las líneas punteadas representan valores para el agua pura (extraídos de NIST).

Las tendencias mostradas por el sistema en diferentes condiciones de concentración inicial de lactoalbúmina fueron similares: sin importar la densidad de trabajo, el comportamiento de la suspensión no distó mucho del comportamiento del agua pura. En todos los casos, los pares de datos P vs T trazan una línea recta con pendiente similar a la del agua pura, y un leve desplazamiento respecto de esta. Para realizar un análisis más minucioso, se evalúa a qué densidad de agua pura corresponde exactamente cada punto P vs T obtenido

experimentalmente con la suspensión y se promedian. Así, se obtiene un valor de densidad de agua pura para cada curva experimental, y se lo compara con el valor real de densidad trabajado.

En la Tabla 6 se puede ver el error porcentual entre el valor de densidad real de trabajo y la densidad de agua pura obtenida del NIST a las mismas condiciones de presión y temperatura:

Concentración (lact./agua)	Densidad (g/mL)				
	0.75	0.77	0.8	0.82	0.85
3%	0,52%	0,89%	0,88%	0,92%	1,06%
5%	1,15%		1,75%	1,03%	2,44%
10%			0,10%	0,65%	0,72%
15%				0,36%	

Tabla 6. Diferencia porcentual promedio entre la densidad de agua pura y la real utilizada.

En la mayoría de los casos ronda el 1%, lo que significa que trabajando en el reactor con los parámetros de T y P entre los valores definidos por los ensayos isocóricos, sustituir el valor de la densidad de la suspensión por la del agua pura a dicha P y T en los cálculos, va a suponer un error insignificante en el resultado.

Como la pendiente de la curva experimental es similar a las del agua pura, se puede suponer con un mínimo error que una vez que el sistema en reacción alcanza el estado estacionario, la densidad global del sistema lactoalbúmina-agua permanece constante en todo su volumen e igual a la del agua pura a las mismas condiciones de presión y temperatura.

Por otro lado, en la figura 8 se evidencia un comportamiento interesante: en los ensayos a densidades globales de 0,85 g/mL y 0,82 g/mL la suspensión de lactoalbúmina muestra menores presiones que el agua pura para una misma temperatura, pero para las demás densidades esta tendencia se invierte. Dichas significativas diferencias de presión han de tenerse en cuenta para el diseño de diversos procesos. Este fenómeno puede deberse a la producción de gases durante la reacción, sobre todo si se considera que los ensayos llevados a cabo a menores densidades son aquellos en los que se llega a mayores temperaturas (lo cual favorece la formación de gases de descomposición)

Los resultados obtenidos sirven para definir los límites del rango de trabajo para los parámetros operativos del reactor continuo, teniendo en cuenta tanto la factibilidad como la efectividad de los tratamientos a realizar. Al trabajar dentro de los valores de presión y temperatura evaluados en esta instancia, se puede asegurar no sólo la existencia de una sola fase con densidad constante y similar a la del agua dentro del reactor, sino también su operación en condiciones seguras.

6.2 Análisis de los productos obtenidos en los ensayos

Enfocándose más particularmente en la reacción de hidrólisis, se pudo observar una marcada tendencia en cuanto a la recuperación de sólidos luego de cada ensayo. Los porcentajes obtenidos se mostraron dependientes de la temperatura máxima alcanzada, obteniéndose valores más altos con menores temperaturas de trabajo.

En la figura 12 se puede visualizar fácilmente el fenómeno en cuestión, sin discriminar entre las concentraciones iniciales:

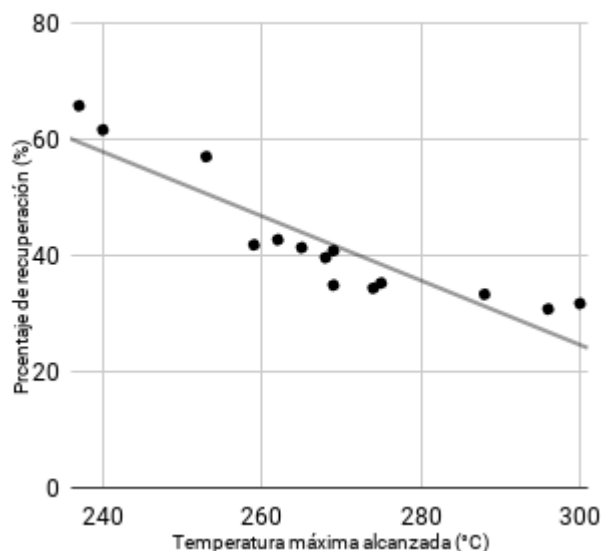


Figura 13. Relación entre el porcentaje de recuperación de sólidos y la Temperatura máxima alcanzada en el tratamiento.

Este mismo comportamiento puede observarse al estudiar cada grupo de concentraciones iniciales por separado, con lo cual se descarta cualquier influencia de esta variable sobre la tendencia. Más aún, no se ha encontrado una diferencia significativa en los porcentajes de recuperación para ensayos con concentraciones iniciales distintas pero temperaturas máximas alcanzadas similares.

La relación que se observa entre ambos parámetros se corresponde con aquella que menciona la bibliografía: los tratamientos más severos (sobre todo en cuanto a temperatura) son los que provocan una mayor pérdida de sólidos, posiblemente debido a un grado más elevado de producción de componentes volátiles o precipitados. Se decidió tomar la temperatura máxima alcanzada como variable independiente ya que es un parámetro proporcional a la cantidad total de energía recibida por la suspensión.

Al analizar los extractos mediante HPLC se encontró que la misma tendencia se repite para los porcentajes de recuperación de aminoácidos libres. En los siguientes gráficos se pueden ver los valores obtenidos tanto para sólidos totales como para aminoácidos totales:

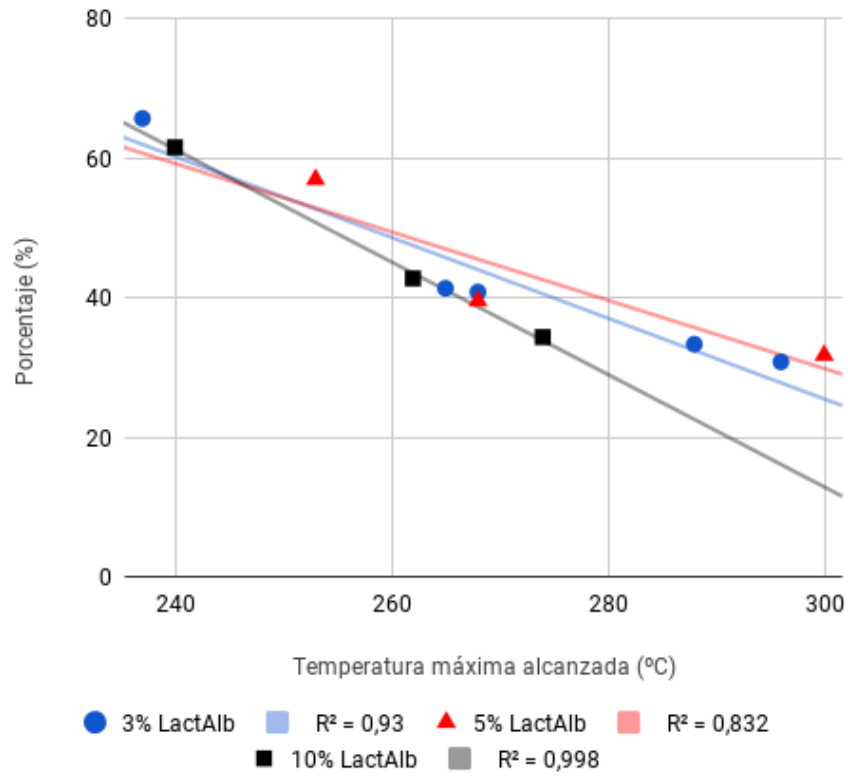


Figura 14. Dependencia en la recuperación de sólidos totales con la temperatura.

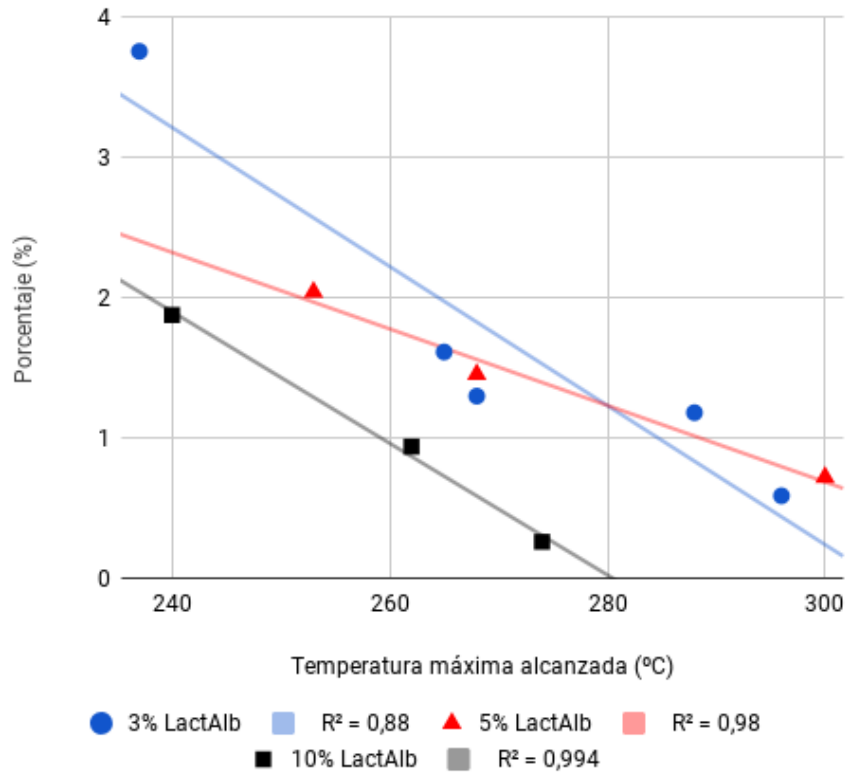


Figura 15. Dependencia de la recuperación de aminoácidos libres totales con la temperatura.

Es visible que independientemente de la concentración inicial se obtienen mejores rendimientos de aminoácidos libres cuando la temperatura alcanzada fue menor, situación que ocurría a mayores densidades. El porcentaje más alto alcanzado fue 3,75%, correspondiente a el ensayo de concentración inicial 3% y densidad de 0,85 g/ml, en el cual la temperatura máxima alcanzada fue de 237 °C (la más baja de todas). El porcentaje más bajo obtenido fue de 0,26% y corresponde al ensayo de 10% y 0,80 g/ml, donde se llegó a una temperatura máxima de 274 °C. Teniendo en cuenta que el tiempo de reacción en todos los casos rondó las 5 o 6 hs, los resultados obtenidos se condicen con la bibliografía al observar que los máximos en la obtención de aminoácidos para estos tiempos se dan cerca de 230 °C (Rogalinski et al., 2008).

En aquellos ensayos donde la temperatura máxima alcanzada fue menor a 280 °C el aminoácido de mayor porcentaje de recuperación fue fenilalanina, mientras que en los ensayos cuya temperatura máxima fue mayor a 280 °C, lisina fue el más recuperado y además, el único que aumentó su porcentaje de recuperación con la temperatura. Los resultados son similares a los encontrados por Espinoza et al. (2012), quienes obtuvieron mayores concentraciones de aminoácidos a 250 °C, excepto lisina y triptófano cuyo máximo estuvo a los 300 °C.

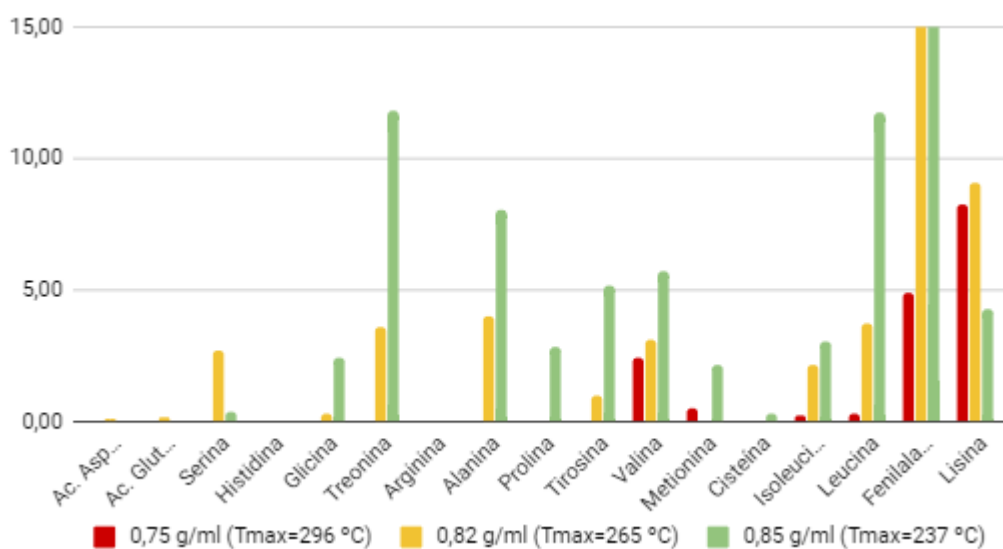


Figura 16. Recuperación de aminoácidos para ensayos seleccionados. Las columnas de fenilalanina fuera de escala tienen valores de 80,12% para 0,85 g/ml (Tmax=237 °C) y 30,91% para 0,82 g/ml (Tmax=265 °C).

Por otro lado, los porcentajes de recuperación de aspártico, glutámico, histidina, arginina y cisteína nunca superan el 1%. Esto es consecuente a lo ensayado por Abdelmoez et al. (2007), en cuyas experiencias se observó que cisteína y glutámico son los aminoácidos más lábiles, seguidos por aspártico, treonina y arginina, ninguno de los cuales resiste temperaturas mayores a 230 °C. Además la arginina se descompone a prolina a partir de los 230 °C, fenómeno que complementa a la baja estabilidad térmica explicando la escasa recuperación de este aminoácido. En cuanto a la histidina, no es de los aminoácidos más lábiles, pero su baja

recuperación puede entenderse bajo el punto de vista de su velocidad de descomposición: al ser uno de los aminoácidos de menor índice hidropático (escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofiliidad de las cadenas laterales), se descompone mucho más rápido que los demás (excepto Asp, Glu, Lys y Arg), y puede ser una de las razones por las que no se pueda cuantificar (Sato et al., 2004).

Si bien prolina y ácido glutámico son los aminoácidos más abundantes en la lactoalbúmina, sus porcentajes de recuperación en los ensayos isocóricos resultaron muy bajos. Para el caso del ácido glutámico, esto se debe probablemente a las razones anteriormente mencionadas. Por otro lado, es posible que la razón por la cual solo una pequeña fracción de la prolina pudo ser cuantificada sea la dificultad que presenta el método de derivatización utilizado, como se ha explicado en la sección 2.3.

Estos resultados obtenidos del estudio de sólidos totales y aminoácidos libres luego de la reacción sirven para acotar aún más el rango de parámetros de operación del reactor continuo. Con estos datos, se pueden realizar ajustes apuntando a un tratamiento más efectivo y económico.

6.3 Diseño del equipo de procesamiento de proteínas

6.3.1 Diseño del precalentador

Lo que primero se calculó fue el coeficiente de transferencia de calor por convección para el fluido frío, siendo este la suspensión de lactoalbúmina en agua. Como el fluido frío experimenta un cambio entre su temperatura inicial y final, se calculó el h en ambos extremos y se utilizó un promedio de este para el cálculo del U global.

Para los cálculos se utilizó la condición más desfavorable, con el máximo caudal másico de fluido (9,9 g/min) y temperatura del horno (270 °C) utilizados. Además, se hicieron algunas suposiciones:

- Las propiedades de la suspensión (C_p , k , μ , ν) son iguales a las del agua pura
- La temperatura final de la suspensión es 268 °C

DATOS FLUIDO A CALENTAR (Suspension de lactoalbumina en agua)							
inicial				final			
Magnitud		Observación		Magnitud		Observación	
$C_{p_{F,i}}$	J/kg*K	4155	Extraído de NIST	$C_{p_{F,f}}$	J/kg*K	4998	Extraído de NIST
$k_{F,i}$	W/m*K	0,6491	Extraído de NIST	$k_{F,f}$	W/m*K	0,6059	Extraído de NIST
m_{Fmax}	kg/s	1,67E-04		m_{Fmax}	kg/s	1,67E-04	
$q_{Fmax,i}$	m3/s	1,68E-07		$q_{Fmax,f}$		2,15E-07	
$v_{F,i}$	m/s	0,2566		$v_{F,f}$		0,3282	
$T_{F,i}$	°C	50		$T_{F,f}$	°C	268	
$\mu_{F,i}$	Pa*s	0,0005	Extraído de NIST	$\mu_{F,f}$	Pa*s	0,0001	Extraído de NIST
$\rho_{F,i}$	kg/m3	993	Extraído de NIST	$\rho_{F,f}$	kg/m3	777	Extraído de NIST
$Re_{F,i}$		424		$Re_{F,f}$		2340	
$Pr_{F,i}$		3,5		$Pr_{F,f}$		0,8	
$Nu_{F,i}$		3,7 ^a		$Nu_{F,f}$		3,7 ^a	
$h_{int,i}$	W/m2*K	2625		$h_{int,f}$	W/m2*K	2456	
$h_{int,prom}$	W/m2*K	2541					

Tabla 7. Cálculo del coeficiente de transferencia de calor interno.

^a Correlación para la convección forzada con flujo laminar ($Re < 2300$) en interior de tubo horizontal. Hidrodinámica totalmente desarrollada:

$$Nu_d = 3,66 + \frac{0,065 \frac{d}{L} Re_d Pr}{1 + 0,04 \left(\frac{d}{L} Re_d Pr \right)^{2/3}} \quad (32)$$

Se utilizó el subíndice “i” para las condiciones iniciales, “f” para las finales, y “F” para identificar al fluido frío.

En segundo lugar se calculó el coeficiente de transferencia de calor por convección para el fluido calefactor, es decir el aire que rodea el tubo. Supuestos:

- El aire no contiene humedad
- La temperatura del aire que rodea el tubo se mantiene estable a 270 °C

DATOS FLUIDO CALEFACTOR (AIRE SECO)			
Magnitud			Observación
C_{pC}	J/kg*K	1039	Extraído de Incropera - DeWitt
k_C	W/m*K	0,0435	Extraído de Incropera - DeWitt
β_C	$^{\circ}C^{-1}$	0,0019	Extraído de Singh (a 250 $^{\circ}C$)
ν_C	m ² /s	6,53E-05	Extraído de Incropera - DeWitt
T_C	$^{\circ}C$	270	
μ_C	Pa*s	2,86E-05	Extraído de Incropera - DeWitt
ν_C	m ² /s	4,46E-05	Extraído de Incropera - DeWitt
ρ_C	kg/m ³	0,6418	Extraído de Incropera - DeWitt
Pr_C		0,69	
L_{cRa}	m	0,15 ^b	
Ra_C		961619	
Nu_C		12,6 ^c	
h_{ext}	W/m ² *K	206	

Tabla 8. Cálculo del coeficiente de transferencia de calor externo.

^b Longitud característica del Rayleigh para espacios entre los cuerpos y sus recintos (Lin y Akins, 1986):

$$L_c = \left(3 - \frac{D_i}{D_o}\right) * \left(1 - \frac{\pi}{4} \left(\frac{D_i}{D_o}\right)^3\right) * \left(3 * \left(1 + \frac{\pi}{4} \left(\frac{D_i}{D_o}\right)^2\right)\right)^{-1} * \frac{D_o}{2} \quad (33)$$

Siendo D_i el diámetro del tubo y D_o el del horno (tomado como el ancho)

^c Correlación para la convección natural con flujo laminar sobre un tubo o cilindro horizontal. Para $10^6 < Ra < 10^9$ y $Pr > 0,5$:

$$Nu_d = 0,36 + \frac{0,518 Ra_d^{1/4}}{\left\{1 + \left(\frac{0,56}{Pr}\right)^{9/16}\right\}^{4/9}} \quad (34)$$

En este caso se utilizó el subíndice “C” para identificar al fluido caliente. Se puede observar que el valor del número de Rayleigh obtenido para las condiciones planteadas es muy superior a los 10000, lo que confirma que se produce el fenómeno de convección natural en el interior del horno calefactor. Al realizar el cálculo con las propiedades del aire a 200 $^{\circ}C$ se llega a la misma conclusión. Puede verse que la transferencia de calor desde el aire caliente hacia el tubo es el “cuello de botella” del sistema calefactor.

Con los coeficientes de transferencia de calor por convección definidos, se pudo calcular el coeficiente global de transferencia de calor U a partir de la fórmula definida en el marco teórico (Ecuación 10). Se consideró despreciable el aporte de la radiación a la transferencia total de calor, ya que la diferencia de temperatura entre el cuerpo emisor de energía (paredes y resistencia del horno) y el receptor (tubo de acero) es mínima una vez que el sistema se

encontraba en estado estacionario. El coeficiente global luego fue introducido en la ecuación de enfriamiento de Newton y se despejó el área:

$h_{int, prom}$	W/m ² *K	2541
h_{ext}	W/m ² *K	205
k_{tubo}	W/m*K	16,3 ⁶
d_{int}	m	0,00091
d_{ext}	m	0,00269
P	m	0,00846
U	W/m ² *K	163
Q	W	166
MLDT	°C	46
A	m ²	0,022
L	m	2,599

Tabla 9. Cálculo del área y largo del intercambiador.

Dando ésta 220 cm². Teniendo el área calculada, se despejó el largo y dio 2,599 m. Siendo que el h_{int} depende de un factor geométrico del tubo D/L, con el largo obtenido se tuvo que iterar y volver a calcular el h_{int} hasta que L converja en un valor:

	L (m)	h_{int} (W/m ² *K)	nuevo L (m)
1º iteración	2,000	2550	2,599
2º iteración	2,599	2543	2,600

Tabla 10. Resultados del cálculo iterativo del largo.

El valor del largo del intercambiador converge en 2,60 m. Este valor es el máximo que se obtiene al variar las condiciones de operación. Para una temperatura final de 200 °C y un flujo másico de 1,5 g/min (situación de mínimos requerimientos) se llega a un largo requerido de 0,4 m. Se decidió definir un largo real de 2,70 m para el precalentador, dado que es suficiente para transferir la cantidad de calor que se requiere en las condiciones de operación más severas, teniendo además un pequeño factor de seguridad. El hecho de definir un único largo real para todas las condiciones de operación implica que al operarse el equipo en aquellos ensayos cuyo requerimiento de intercambio de calor es mínimo, este quedaría sobredimensionado cerca de 700%. Afortunadamente, como el diámetro interno del intercambiador es mucho menor al del reactor, el exceso de volumen que supone el mismo representa una variación menor al 1% del volumen efectivo del equipo final.

⁶ A 100 °C según “STEEL PRODUCTS MANUAL: STAINLESS STEEL”, publicado por Iron & Steel Society en marzo de 1999

6.3.2 Diseño del reactor

Recordando la sección 5.3.2.2, para dimensionar el reactor se deben utilizar las ecuaciones del tiempo de residencia y volumen óptimos. Ambas expresiones fueron evaluadas para distintas condiciones. Para esto, se utilizaron valores de las constantes cinéticas para 230 y 270 °C disponibles en los trabajos de Rogalinski de 2008. Para realizar la modelización a 200 °C se tuvieron que calcular los valores de las constantes cinéticas de formación y degradación de aminoácidos a partir de la ecuación de Arrhenius, con parámetros extraídos también del trabajo de Rogalinski:

	k_0 (1/s)	E_a (kJ/mol)	k_i (1/s)
Formación	7,40E+11	157,2	3,27E-06
Descomposición	1,90E+20	236,5	1,48E-06

Tabla 11. Cálculo de constantes cinéticas para 200 °C.

Con estos valores, y teniendo en cuenta que la bomba disponible trabaja a caudales comprendidos entre los 0,1 y los 9,9 g/min, se realizaron los cálculos correspondientes para el volumen del reactor y el tiempo de residencia:

Temperatura (°C)	k_f (1/s)	k_d (1/s)	τ (min)
200	3,27E-06	1,48E-06	7320
230	4,10E-05	4,40E-05	392
270	4,00E-04	2,20E-03	16

Tabla 12. Cálculos de tiempos de residencia óptimos.

Se utilizó el subíndice “f” para referirse a la constante cinética de formación de aminoácidos y “d” para la de destrucción. Se calculó que los tiempos de residencia óptimos fueron de 122 h para 200 °C, 6,5 h para 235 °C y de 15,8 min para 270 °C. En base a los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la densidad del sistema para cada temperatura de operación, se tuvo que definir un volumen que permita trabajar en el tiempo de residencia óptimo para las 3 temperaturas. Esto no fue del todo posible, ya que con el flujo máximo el volumen requerido para los ensayos a 270 °C fue menor que el requerido a flujo mínimo para los ensayos a 200 °C (Tabla 13). En base a esta restricción impuesta por el rango operativo de la bomba, se tuvo que trabajar a tiempos óptimos sólo en dos de las tres temperaturas de ensayo. Las posibilidades presentadas son dos: un volumen de reactor entre 47 y 204 ml, o entre 839 y 4681 ml. Ante esta situación, por simplicidad y disponibilidad de materiales, se optó por un reactor entre 47 y 204 ml, permitiendo conseguir tiempos de residencia óptimos para los ensayos a 235 y 270 °C. Para construir el reactor se decidió acoplar dos tubos de acero inoxidable de 1/4 plg de diámetro para llegar a un volumen final de 131,48 mL. Al tener un reactor con dicho volumen, se puede trabajar con los tiempos de residencia óptimos tanto para 235 como para 270 °C ajustando el flujo másico que entrega la bomba.

Temperatura (°C)	Densidad (g/ml)	Tao optimo (min)	Flujo disponible (g/min)	Volumen requerido (ml)
200	0,87237	7320	min 0,1	839
			max 9,9	83070
230	0,82899	392	min 0,1	47
			max 9,9	4681
270	0,77653	16	min 0,1	2
			max 9,9	204

Tabla 13. Cálculo del volumen del reactor.

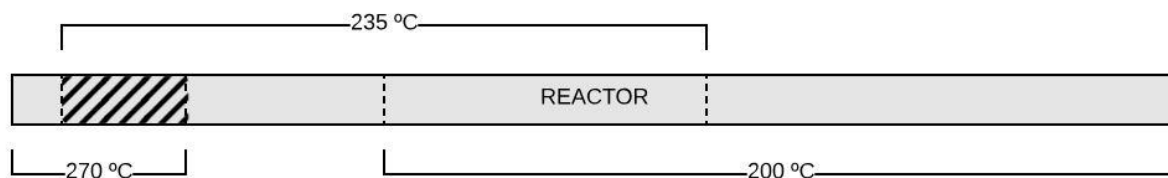


Figura 17. Esquema no a escala de la longitud de reactor requerida para cada temperatura. La zona rayada representa el rango elegido.

Al evaluar las condiciones de flujo dentro del reactor, se observó que los valores de Re no llegan a ser lo suficientemente altos como para afirmar que se tiene un régimen turbulento.

Nro de Reynolds para cada ensayo			
\dot{m} (m3/s)	T (°C)		
	200	235	270
3,65E-08 (60 min)	88	99	108
7,30E-08 (30 min)	177	199	217
1,46E-07 (15 min)	354	398	433
2,19E-07 (10 min)	531	597	650

Tabla 14. Número de Reynolds para cada ensayo realizado.

Esto genera que las velocidades de reacción y las concentraciones de las distintas especies formen perfiles parabólicos en la sección transversal del reactor. La principal complicación que este fenómeno acarrea es la disminución del rendimiento del reactor. Para alcanzar un flujo turbulento, se debería aumentar el caudal de inyección de la bomba y/o la temperatura de operación, para hacer que la viscosidad disminuya aún más. Esto ha de ser acompañado por un aumento proporcional del volumen del reactor, para asegurar que el tiempo de residencia no varíe. Como no se disponía de tiempo ni materiales para hacer esto, se decidió operar el reactor a pesar de estas consideraciones.

Cabe destacar que tanto los parámetros de diseño (materiales utilizados) como los parámetros operativos (flujos, presiones y temperaturas) del reactor se encontraban sujetos a la limitación de material y equipos disponibles en la planta piloto de la facultad.

6.3.3 Diseño del enfriador

Los pasos seguidos para dimensionar el enfriador fueron similares a los realizados con el precalentador. En primer lugar, se calculó el coeficiente de transferencia de calor por convección para el fluido frío. En este caso, se tuvo en cuenta la suposición de que todo el calor que absorbe el líquido refrigerante proviene de la corriente de salida del reactor (es decir, que funciona de manera adiabática):

DATOS FLUIDO FRÍO (Agua)							
inicial				final			
Magnitud		Observación		Magnitud		Observación	
$C_{pF,i}$	J/kg*K	4219	Extraído de NIST	$C_{pF,f}$	J/kg*K	4195	Extraído de NIST
$k_{F,i}$	W/m*K	0,5611	Extraído de NIST	$k_{F,f}$	W/m*K	0,5801	Extraído de NIST
$\beta_{F,i}$	$^{\circ}C^{-1}$	6,81E-05	Extraído de Mills	$\beta_{F,f}$	$^{\circ}C^{-1}$	9,50E-05	Extraído de Mills
$\alpha_{F,i}$	m ² /s	1,31E-05	Extraído de Singh	$\alpha_{F,f}$	m ² /s	1,37E-05	Extraído de Singh
$T_{F,i}$	$^{\circ}C$	0		$T_{F,f}$	$^{\circ}C$	10	
$\mu_{F,i}$	Pa*s	0,00179	Extraído de NIST	$\mu_{F,f}$	Pa*s	0,00131	Extraído de NIST
$\rho_{F,i}$	kg/m ³	999,8	Extraído de NIST	$\rho_{F,f}$	kg/m ³	999,7	Extraído de NIST
$Pr_{F,i}$		13		$Pr_{F,f}$		9	
Lc_{Ra}	m	0,07 ^a		Lc_{Ra}	m	0,07 ^a	
$Ra_{F,i}$		159		$Ra_{F,f}$		291	
$Nu_{F,i}$		2 ^b		$Nu_{F,f}$		2 ^b	
$h_{ext,i}$	W/m ² *K	433		$h_{ext,f}$	W/m ² *K	502	
$h_{ext,prom}$	W/m ² *K	468					

Tabla 15. Cálculo del coeficiente de transferencia de calor externo.

^a Ecuación 33.

^b Ecuación 34.

Una vez definido h_{ext} , se procedió a calcular h_{int} utilizando 2,00 m como primer valor del largo para la iteración (requerido en la fórmula del Nusselt). Se utilizó este largo porque es el total del tubo que se disponía.

DATOS FLUIDO A ENFRIAR (Mezcla acuosa)							
inicial				final			
Magnitud			Observación	Magnitud			Observación
$C_{p,C,i}$	J/kg*K	4997,6	Extraído de NIST	$C_{p,C,f}$	J/kg*K	4148,5	Extraído de NIST
$k_{C,i}$	W/m*K	0,6059	Extraído de NIST	$k_{C,f}$	W/m*K	0,6039	Extraído de NIST
m_{Cmax}	kg/s	1,67E-04		m_{Cmax}	kg/s	1,67E-04	
$q_{Cmax,i}$	m3/s	2,15E-07		$q_{Cmax,f}$	m3/s	1,66E-07	
v	m/s	0,3282		v	m/s	0,2539	
$T_{C,i}$	°C	268		$T_{C,f}$	°C	20	
$\mu_{C,i}$	Pa*s	0,0001	Extraído de NIST	$\mu_{C,f}$	Pa*s	0,001	Extraído de NIST
$\rho_{C,i}$	kg/m3	776,5	Extraído de NIST	$\rho_{C,f}$	kg/m3	1003,6	Extraído de NIST
$Re_{C,i}$		2338		$Re_{C,f}$		233,3	
$Pr_{C,i}$		0,8		$Pr_{C,f}$		6,8	
$Nu_{C,i}$		3,8 ^c		$Nu_{C,f}$		3,8 ^c	
$h_{int,i}$	W/m2*K	2516		$h_{int,f}$	W/m2*K	2494	
$h_{int,prom}$	W/m2*K	2505					

Tabla 16. Cálculo del coeficiente de transferencia de calor interno.

^c Ecuación 32.

Con los coeficientes de transferencia de calor por convección calculados, al igual que con el precalentador, se obtuvo el U de la ecuación 10 y luego el área, a partir de la cual se despejó el largo. Nuevamente se realizaron iteraciones hasta encontrar valores convergentes:

$h_{int,prom}$	W/m2*K	2505
$h_{ext,prom}$	W/m2*K	468
k_{tubo}	w/m*K	16,3
d_{int}	m	0,00091
d_{ext}	m	0,00269
P	m	0,00846
U	w/m2*K	294
Q	W	-189
MLDT	°C	93
A	m2	0,0069
L	m	0,823

Tabla 17. Cálculo del largo del enfriador.

	L (m)	h_{int} (W/m2*K)	nuevo L (m)
1ª iteración	2,000	2460	0,823
2ª iteración	0,823	2505	0,818
3ª iteración	0,818	2506	0,818

Tabla 18. Resultados del cálculo iterativo del largo.

De esta manera, queda definido un largo de enfriador requerido de 0,818 m para la operación del equipo a 270 °C y 9,9 g/min. Teniendo en cuenta que duplicar el largo del enfriador no tiene influencia sobre los resultados del ensayo y que se disponía del tubo, se decidió sobredimensionar el equipo en un 200%. Además, de esta manera se protegía la válvula con mayor seguridad, y se contrarrestaban los efectos de calentamiento que podía generar el ambiente sobre el agua fría, que no habían sido considerados en los cálculos.

6.4 Análisis de los productos del reactor

Ya realizadas las corridas y analizados los extractos del reactor mediante HPLC, se procesó la información recabada en tablas y gráficos que muestran la concentración de aminoácidos en función de las variables T y τ . En algunos casos se estudió la concentración total de aminoácidos y en otros se discriminó el comportamiento de cada aminoácido por separado. De los primeros se pudo observar la eficiencia de la hidrólisis general y la severidad de los ensayos, y de los segundos el aporte de cada aminoácido y la influencia de la variación de la concentración de cada uno de ellos en los resultados generales. Además, estudiar los aminoácidos por separado permitió comprender mejor lo que ocurría en el reactor, siendo también un análisis que puede servir para estudios próximos basados en el mismo tema.

Cabe mencionar que para todos los análisis que se presentan a continuación se decidió dejar de lado la prolina. Esto se debe a la variabilidad en los resultados obtenidos y a la dificultad que supone su cuantificación con el método utilizado, tema que ha sido tratado en la sección 2.3.

Comparación con Rogalinski et al.

Un punto de comparación encontrado para evaluar la eficiencia en la recuperación de aminoácidos en este proyecto, fueron los estudios de Rogalinski et al. La concentración de aminoácidos totales que se recuperó en cada ensayo en g/gLactAlb se muestra en los siguientes gráficos, agrupados en base a la temperatura de operación.

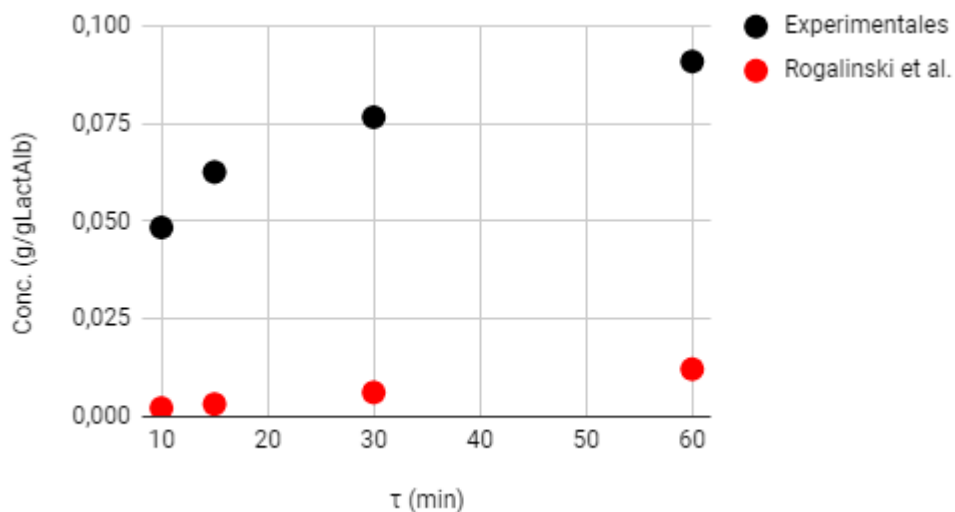


Figura 18. Recuperación de aminoácidos a 200 °C.

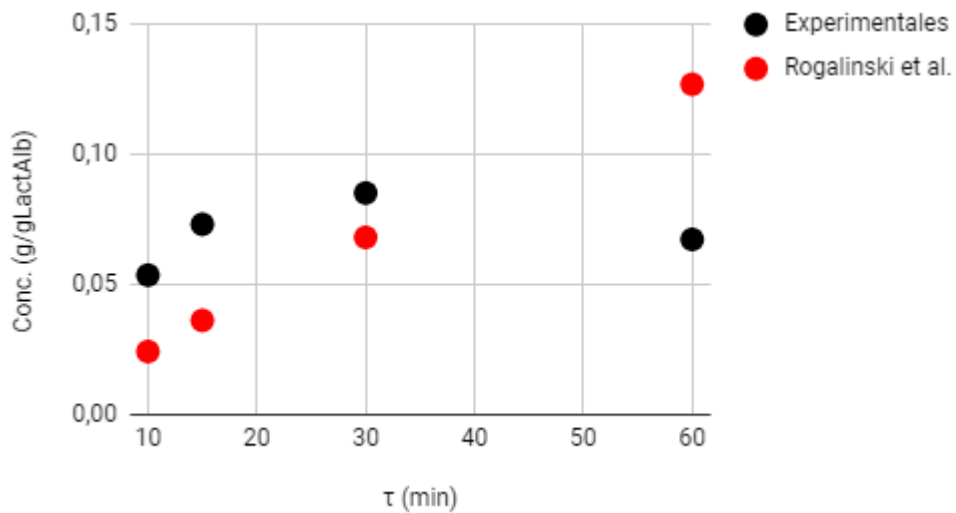


Figura 19. Recuperación de aminoácidos a 235 °C.

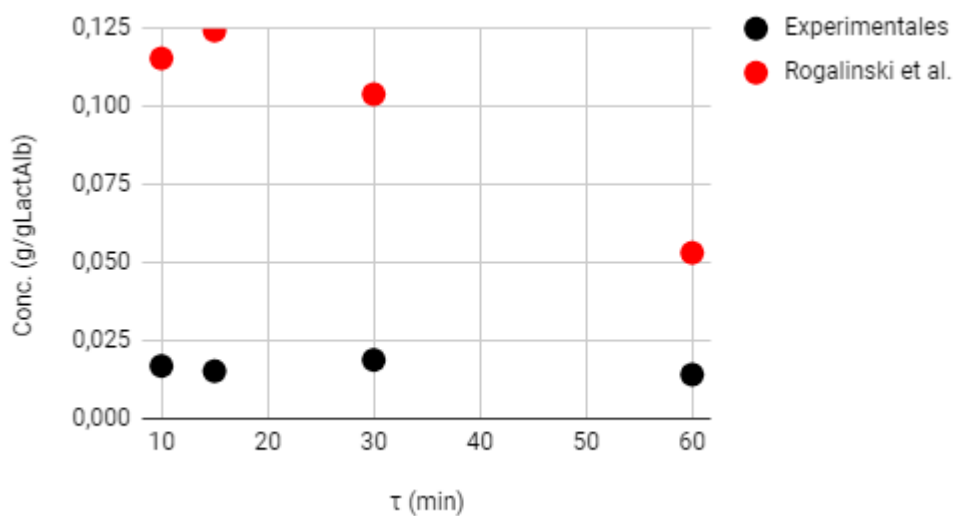


Figura 20. Recuperación de aminoácidos a 270 °C.

Tanto a 200 como a 235 °C se pueden observar tendencias bien definidas, ajustándose cada punto a una curva que tiende a un máximo para luego disminuir. Si se comparan los datos experimentales obtenidos con la bibliografía, se obtiene un resultado distinto para cada temperatura ensayada. En todos los puntos ensayados a 200 °C se recuperaron sustancialmente más aminoácidos de los que predice el modelo que se utilizó para diseñar el reactor. Se realizó un análisis más intensivo sobre la tendencia que se muestra en los datos experimentales estimando constantes cinéticas, con el cual se pudo proyectar un máximo rendimiento de aminoácidos de 0,086 g/gLactAlb a tiempos de residencia de alrededor de 5 h, en contraste con una recuperación de 0,52 g/gLactAlb a 122 h que se esperaban inicialmente. Es interesante evaluar estas tendencias a fin de conocer los resultados de este proyecto, pero cabe destacar

que cualquier conclusión realizada a partir de correlaciones de tan solo 4 puntos carece de sustento como para realizar el diseño o la parametrización de equipos.

En la Figura 18 se puede evidenciar que los ensayos a 235 °C de 10, 15 y 30 minutos de reacción arrojaron valores de recuperación de aminoácidos muy similares a los que predice el modelo cinético extraído de la bibliografía. Sin embargo, con 60 minutos de reacción se encontró un valor menor al esperado, el cual también es menor a los correspondientes a 15 y 30 minutos. Se puede observar entonces el mismo fenómeno descrito para las operaciones a 200 °C: se alcanza un máximo de recuperación menor al esperado y a menores tiempos. En este caso, el máximo valor de recuperación fue de 0,085 g/gLactAlb (a 30 minutos), comparado con el esperado de 0,35 g/gLactAlb (a 6,5 horas). Por otro lado, al hacer la comparación con los ensayos a 200 °C, se observa que se obtienen valores levemente superiores para los primeros tres tiempos de residencia, mientras que la recuperación total para 60 minutos es notablemente menor.

Los resultados que se obtuvieron para los ensayos a 270 °C no son tan concluyentes. Si bien vuelve a ocurrir que se obtuvo un máximo menor al esperado, no puede afirmarse que se observa una tendencia bien definida como en los casos anteriores. Por otro lado, es visible que para todos los tiempos de residencia se recuperaron cantidades muy inferiores de aminoácidos que a menores temperaturas, teniéndose en este caso un máximo de 0,019 g/gLactAlb ($\tau=30$ min).

Efecto del tiempo de residencia

Al comparar los ensayos realizados a una temperatura determinada entre sí, se puede observar el efecto del tiempo de residencia sobre la cantidad de aminoácidos recuperados. En este caso se estudió cada aminoácido por separado, ya que la tendencia experimentada varía notablemente en cada caso.

Para aquellas corridas a 200 °C, la mayoría de los aminoácidos aumenta su concentración proporcionalmente al tiempo de residencia, indicando que la energía otorgada a esta temperatura era suficiente para liberarlos de la cadena peptídica pero no llegó a destruirlos. En otros casos como los del ác. aspártico, serina, treonina, metionina e isoleucina, su concentración experimentó un pico máximo antes de la hora de tiempo de reacción. Esto es un parámetro que define la estabilidad térmica de estos aminoácidos, siendo menos resistentes que aquellos que tenían su máximo de concentración a 60 min.

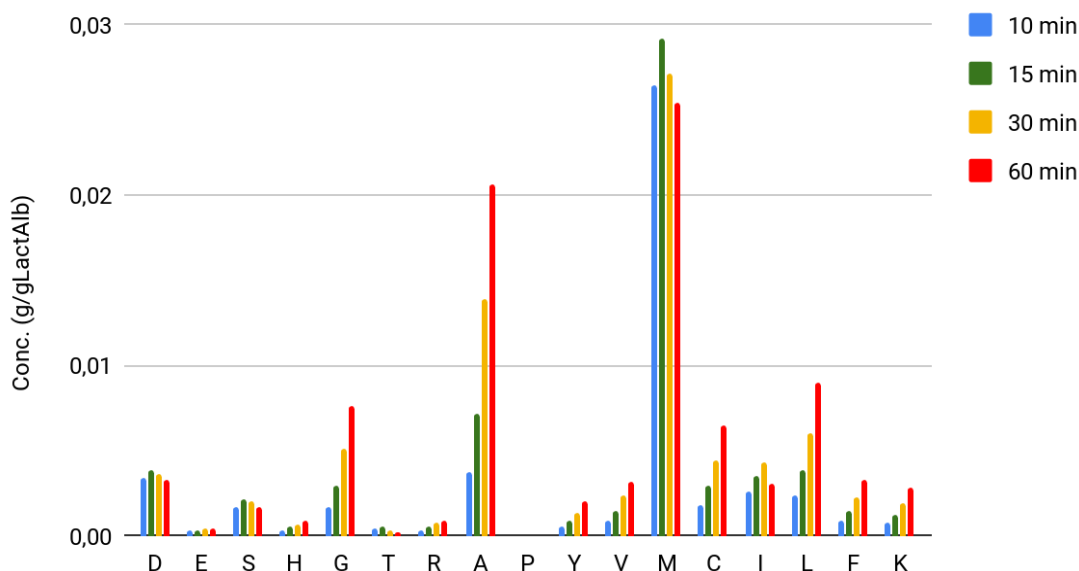


Figura 21. Comparación de tiempos de residencia a 200 °C.

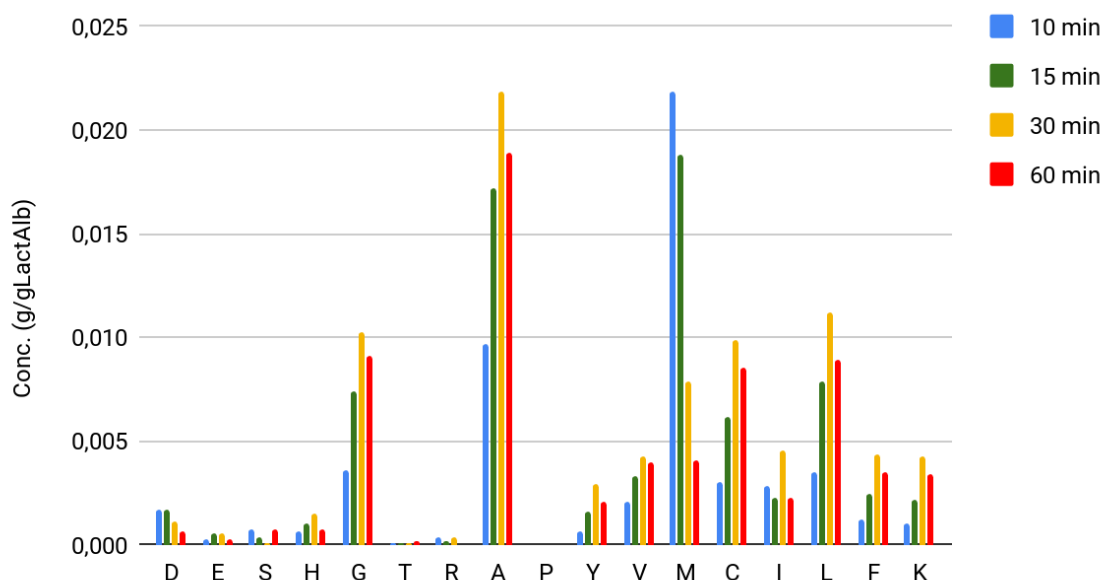


Figura 22. Comparación de tiempos de residencia a 235 °C.

A 235 °C se encontró que la recuperación de varios aminoácidos era máxima a tiempos de residencia de 30 minutos. A diferencia de los ensayos a 200 °C, ningún aminoácido mostró un máximo a 60 minutos, como era de esperarse dada la tendencia que se observó en la recuperación total. Un caso interesante es el de la metionina: como puede verse, tuvo un máximo a 10 minutos de reacción, y su recuperación fue notablemente menor a mayores tiempos.

Aquellos aminoácidos que a 200 °C experimentaron un pico de concentración a tiempos de residencia menores a 60 min, tuvieron su mejor rendimiento en los ensayos a 235 °C con el menor tiempo de residencia utilizado (excepto isoleucina cuyo pico de 0,0045 g/gLactAlb puede

deberse a un error en la cuantificación, y treonina, del cual solo se encontraron cantidades ínfimas). Por otro lado, para el resto de los aminoácidos el máximo encontrado a 60 minutos de reacción a 200 °C se desplazó a 30 minutos para 235 °C. Esto puede ser un indicio de que a partir de temperaturas y tiempos de reacción superiores a 235 °C y 30 min la energía que reciben los aminoácidos es excesiva, generando un mayor grado de ruptura de los mismos.

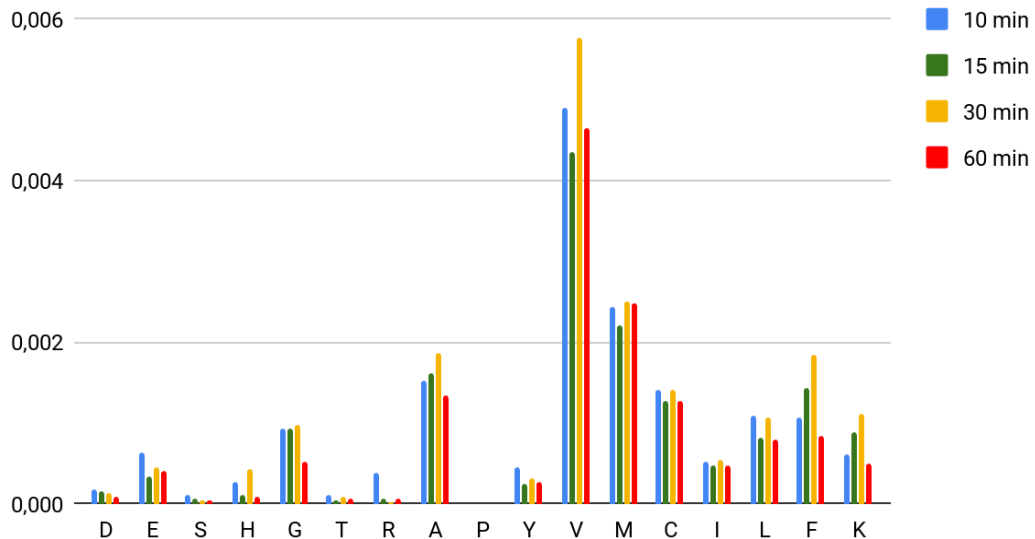


Figura 23. Comparación de tiempos de residencia a 270 °C.

De los valores de concentración obtenidos a 270 °C no pueden extraerse muchas conclusiones. La concentración de los aminoácidos no sigue una tendencia en ninguno de los casos, siendo estos valores muy bajos y casi constantes. Como era de esperar, la temperatura utilizada fue excesiva para los tiempos de residencia trabajados. Comparando con los ensayos a menores temperaturas, resalta el caso de la valina, que fue la especie predominante a 270 °C. Como se ha mencionado anteriormente, la valina es uno de los aminoácidos más termorresistentes y puede ser generada como producto de descomposición de la lisina. Las concentraciones encontradas de alanina también pueden haber sido afectadas por ser un producto de la descomposición parcial de treonina, asparagina y serina.

Efecto de la temperatura

Dado que en sólo dos de las tres temperaturas ensayadas se pudieron observar patrones definidos de concentración de los aminoácidos, es poco certero realizar un análisis exhaustivo sobre la influencia de este parámetro en la recuperación de los mismos. En la Figura 23 se comparan todos los ensayos a 30 min.

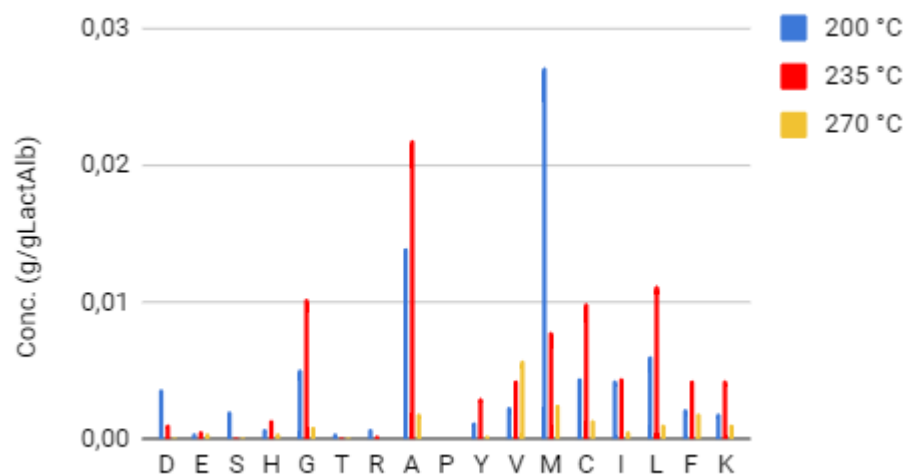


Figura 24. Comparación de temperaturas para 30 minutos de residencia.

Como puede verse la recuperación a 270 °C es despreciable frente a las otras dos temperaturas en todos los casos menos para la valina, cuya concentración aumenta proporcionalmente a la temperatura.

Si se hace foco en la tendencia general que muestra cada aminoácido, uno de los casos más notables es el de la metionina. A 200 °C, se encuentra un máximo de recuperación a 15 minutos de tiempo de reacción, y una disminución considerable a tiempos mayores. Por otro lado, a 235 °C el máximo se encuentra a los 10 minutos, y este es incluso menor que el que se observó a menor temperatura. Asimismo, la disminución de los valores con el aumento del tiempo es más marcada que a 200 °C (figuras 20 y 21). En el otro extremo, a 270 °C se recuperan en comparación muy bajas cantidades, las cuales no parecen ser influenciadas por los distintos tiempos de residencia. La gran mayoría de los aminoácidos estudiados siguen una tendencia similar, con la diferencia de que llegan a máximos en condiciones más severas que la metionina. A 200 °C sus rendimientos aumentan con el tiempo de residencia y a 235 °C lo hacen hasta valores máximos a 30 minutos, luego de los cuales disminuyen levemente. A la temperatura máxima alcanzada, nuevamente se encontraron recuperaciones muy bajas y en muchos casos casi invariantes con el tiempo. La valina presenta una notable excepción a esta tendencia. Este fue el único aminoácido que se encontró a mayores concentraciones conforme se aumenta la temperatura de reacción. Este fenómeno puede deberse en parte a que suele formarse como producto de descomposición de otros aminoácidos más complejos. Sin embargo, no pudo observarse una tendencia similar para la alanina, y la glicina, que comparten esta misma característica. La alanina es el más termolábil de los tres, pero la glicina (al igual que la valina) es particularmente termorresistente. Más aún, ambos aminoácidos mostraron una misma tendencia en cuanto a su recuperación a diferentes condiciones. Otro factor a tener en cuenta es la posible polimerización de la glicina a partir de ciertas temperaturas, fenómeno que limitaría su detección y cuantificación por el método cromatográfico utilizado.

7. CONCLUSIONES

Sobre las propiedades de sistemas isocóricos

La realización de estos ensayos parecía simple en los inicios, pero terminó implicando varias semanas más de lo esperado, ya que durante su ejecución se encontraron dificultades prácticas que no habían sido previstas. En diversas ocasiones se sufrieron despresurizaciones en la celda, causadas por fallas en la hermeticidad de la misma a nivel de las juntas. Estas situaciones alteraban la pendiente presión/temperatura del sistema, por lo que el ensayo debía darse por finalizado tempranamente. Esto da una idea de lo dificultoso que resulta el diseño, construcción y operación de equipos y procesos que trabajan en condiciones tan extremas.

En todos los ensayos se pudo evidenciar a grandes rasgos una tendencia en concordancia con lo esperado: un equilibrio presión temperatura muy cercano al que representa las propiedades del agua pura para una determinada densidad. En la mayoría de los casos, los puntos experimentales se situaban a presiones levemente menores que la línea del agua a la misma densidad (en los gráficos P vs T). Sin embargo, en algunas ocasiones se observó que se alcanzaban mayores presiones que aquellos puntos correspondientes al agua pura para la misma temperatura y densidad. Además, en ciertos ensayos se encontró que la pendiente de la curva trazada por los puntos experimentales era mayor que la esperada para el agua pura, significando un mayor incremento en la presión por cada salto en la temperatura. Se cree que en ambos casos este aumento en la presión fue causado por la generación de gases dentro de la celda, los cuales son resultado de la descomposición de los aminoácidos a altas temperaturas.

Se observó que sin importar la concentración de lactoalbúmina en las suspensiones iniciales, la densidad del sistema no variaba significativamente con respecto a la del agua pura para el rango de temperaturas y presiones ensayadas. La mayor diferencia entre ambas densidades fue de 2,44%, siendo la diferencia promedio de todos los ensayos de tan sólo 0,96%. Esto corroboró la suposición de que la densidad del sistema es igual a la del agua pura y se mantiene constante a lo largo del reactor, lo que facilita mucho el diseño, dado que supone una solución al problema de cambio de densidades en sistemas reactivos.

Sobre el rendimiento de aminoácidos en los ensayos isocóricos

Si bien no era un objetivo principal de esta etapa del proyecto, se llevaron a cabo análisis cromatográficos de los extractos obtenidos de la celda para la cuantificación de aminoácidos libres. En todos los casos fue bajo el rendimiento de aminoácidos obtenido y la variabilidad de los resultados. El promedio de recuperación fue 1,19% con 3,45% como rendimiento máximo (en condiciones de 3% de concentración inicial de lactoalbúmina, 0,85 g/ml de densidad del sistema y 237 °C de temperatura máxima) y una desviación estándar de 0,81%. Tales resultados eran esperables si se tiene en cuenta el excesivo tiempo de reacción y la diferencia entre las temperaturas máximas alcanzadas que se tuvieron en esta etapa. Fueron muy pocos los ensayos que tuvieron una misma duración total, en especial si se consideran los casos en los que fue necesario cancelar las experiencias antes de lo esperado por problemas en la presión de

la celda. Cada ensayo se llevaba a cabo en tiempos que van desde las 4 hasta las 6,5 horas, a lo cual debe agregarse el tiempo que le tomaba a la celda enfriarse por completo.

Sobre el equipo de procesamiento de proteínas a escala piloto

Llevar a cabo las corridas en el reactor implicaba mayor atención y más trabajo que los ensayos isocóricos. El hecho de trabajar en continuo y a menores presiones no hizo del reactor un equipo fácil de utilizar. Algunas de las complicaciones experimentadas fueron detenimientos de la bomba (principalmente al ser operada por largos periodos de tiempo), y ocasionalmente despresurizaciones en el reactor. Haber manejado la bomba, regulado el flujo y la presión manualmente, hizo que el aprendizaje y entendimiento del sistema sea más efectivo. Se debe tener especial cuidado en la construcción de un sistema tan complicado, dado que el hecho de constar de tantos componentes genera varios puntos susceptibles de sufrir pérdidas de presión.

Si bien la bomba utilizada era versátil, trabajando a flujos que abarcan tiempos de residencia en el reactor de entre 15 min y 22 hs (suponiendo una densidad de 1 g/ml), no se realizaron corridas tan largas debido al tiempo del que se disponía para realizar estas experiencias.

Sobre la pureza del reactivo

Un factor que posiblemente influyó la recuperación final de aminoácidos obtenida de estos ensayos es la utilización de proteína al 80%. La presencia de sustancias distintas a la lactoalbúmina en la suspensión de alimentación (como por ejemplo lactosa y sales disueltas) puede entorpecer el proceso de hidrólisis, tal vez afectando la reacción en sí, y el posterior análisis de sus productos. Por otro lado la formación de depósitos sólidos difíciles de recuperar dentro del reactor y/o la separación de fases de distinta polaridad a la salida del mismo son importantes fuentes de variabilidad en los resultados y de disminución del rendimiento, no solo por la pérdida de masa que estos significan sino también por el ensuciamiento que generan en el equipo.

En las experiencias se observó la presencia de una fase resinosa sobrenadando en los extractos y adherida al material de vidrio. Las sustancias que conforman esta fase pueden ser productos de descomposición de la proteína o de alguna otra sustancia encontrada en el reactivo, entre los cuales puede haber habido una porción de los aminoácidos menos polares (F, L, I, Y, M, G, V, S, T) no recuperada en la fase acuosa.

Sobre el régimen de flujo

Otro de los factores que genera cierta incertidumbre en los resultados es el régimen del flujo dentro del reactor. Para que el flujo sea ideal y no exista retromezcla es necesario trabajar con un régimen turbulento. El régimen turbulento supone una menor resistencia a la transferencia de calor desde el diámetro interno al centro del tubo, gracias a la predominancia de mecanismos convectivos de transferencia de calor. En estos casos la temperatura del fluido en el área transversal del cilindro puede considerarse constante. La temperatura en sí misma

no resulta determinante, pero sí cuando tenemos en cuenta que de ella depende la velocidad de reacción. En los casos en los que el régimen turbulento no se encuentra bien desarrollado, se generará un gradiente de temperatura entre el fluido cerca de la pared y el fluido en el centro del tubo. Por esta razón, en las regiones de mayor temperatura se producirá mayor cantidad de producto y de subproductos, induciendo de esta manera procesos difusivos que no son abarcados en el diseño realizado. Además la temperatura también incide en las propiedades físicas del fluido, que varían la velocidad de movimiento del mismo a lo largo del radio. Todo esto hace que el comportamiento del sistema reactivo se aleje del comportamiento ideal.

Para la geometría de trabajo, cualquier flujo con Reynolds menor a 2300 es considerado laminar. Debido a las limitaciones a las que se vio sujeto el presente proyecto, no se pudieron alcanzar valores superiores al mencionado dentro del reactor. Este fenómeno posiblemente tuvo su influencia en cuanto a la variabilidad de los resultados obtenidos y al bajo rendimiento experimentado.

Sobre el enfriador

Como ya se ha mencionado en el desarrollo del proyecto, el enfriador del equipo fue sobredimensionado por una cuestión de seguridad de la válvula de presión. En ese momento no se tuvieron en cuenta los efectos adversos que podría provocar esto sobre la estabilidad de la solución y la precipitación de los aminoácidos.

El hecho de haber llevado la solución a tan bajas temperaturas pudo haber afectado la solubilidad de los compuestos de interés, provocando su precipitación en los tubos del intercambiador y en la válvula de descompresión.

Sobre los resultados generales

En los resultados se puede ver que la mayor recuperación de aminoácidos se dio en la corrida a 200 °C con 60 min de residencia, siendo ésta el 9,1% del producto del reactor. En el otro extremo, el mínimo recuperado fue de 1,4% en el ensayo de mayor severidad. Si se considera a la severidad del tratamiento como un producto no ponderado del tiempo por la temperatura, se puede observar una cierta dependencia entre este parámetro y la recuperación de aminoácidos. Si bien los valores de recuperación obtenidos son bajos en sí mismos, es notable que la operación del equipo tanto a 200 como a 235 °C es mucho más favorable que a 270 °C, dado que a esta última temperatura se recuperó entre 3 y 4 veces menos cantidad de aminoácidos. Además de los bajos rendimientos obtenidos a 270 °C, no se pudo encontrar una tendencia bien definida al evaluar los distintos tiempos de operación, a diferencia de los ensayos a menores temperaturas. Si se comparan con la bibliografía, los resultados obtenidos a 200 y 235 °C son buenos e incluso mejores que los que se esperaban; sin embargo a fines prácticos, valores de recuperación de tan solo 10% de aminoácidos libres resultan poco prometedores. Aumentar los tiempos de residencia es una manera de mejorar el rendimiento, aunque según la bibliografía llegando a 122 hs de reacción sólo se obtendría un 52% de aminoácidos (a 200 °C).

Es interesante ver cómo variaron los rendimientos de recuperación de cada uno de los aminoácidos al modificar las condiciones de operación del reactor. Dadas las diferencias de estabilidad térmica que cada aminoácido tiene, pueden verse distintas tendencias en la obtención de los mismos. Dicho esto, es notable en los resultados que la utilización de temperaturas de 270 °C es sumamente excesiva por el nivel de destrucción que se produce, tanto desde el punto de vista de los aminoácidos particulares como desde el porcentaje de recuperación total. Sumado a esto, es necesario tener en cuenta otros factores, como lo son la polimerización de glicina y el hecho de que tanto ésta como así también alanina y valina son productos de descomposición de otros aminoácidos. Por otro lado, es posible que la solubilidad e incluso el punto isoeléctrico de cada aminoácido hayan influido en su recuperación en la fase acuosa de los extractos.

Consideraciones finales

Como ya se ha mencionado, los bajos rendimientos de aminoácidos libres obtenidos a lo largo del proyecto resultan poco prometedores. La poca cantidad recuperada hace creer que los costos que implica llevar a cabo este proceso de hidrólisis subcrítica a nivel industrial son demasiado elevados y por lo tanto la operación es económicamente inviable. A los costos energéticos y de material asociados al proceso de hidrólisis hay que sumarles aquellos correspondientes a cualquier tratamiento de acondicionamiento de la alimentación que se realice y de los sucesivos procesos de separación, purificación y concentración requeridos para obtener un producto de valor. Por otro lado, también han de tenerse en cuenta las complicaciones que significan llevar a cabo procesos a temperaturas y presiones tan altas a escala industrial.

Sin embargo, los resultados aquí presentados abren las puertas a la realización de un análisis más exhaustivo sobre el comportamiento de cada aminoácido en particular, lo cual puede ser la clave para una implementación de procesos de hidrólisis subcrítica de mayor eficiencia.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Radiant Insights Inc. (2015). Amino Acids Market Size & Research Report, 2022. *Radiant Insights*. Recuperado de: <https://www.radiantinsights.com/press-release/global-amino-acids-market>
- Market Research Future (2018). Global Food Amino Acids Market Research Report-Forecast to 2023. *Market Research Future*. Recuperado de: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/food-amino-acids-market-2777>
- Market Research Future (2018). Unnatural Amino Acids Market Research Report - Global Forecast till 2023. *Market Research Future*. Recuperado de: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/unnatural-amino-acids-market-4909>
- CCM Data & Bussines Intelligence (2017). China's Amino Acid market expands to new application scopes. *CCM Data & Business Intelligence*. Recuperado de: <http://www.cnchemicals.com/Press/90162-China%E2%80%99s%20Amino%20Acid%20market%20expands%20to%20new%20application%20scopes%20.html>
- Gestión (2018). Estas son las oportunidades del mercado para las proteínas en EE.UU. *Gestión*. Recuperado de: <https://gestion.pe/economia/son-oportunidades-mercado-proteinas-ee-uu-225932>
- Fountoulakis, M. & Lahm, H. W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A* 826, 109–134.
- Sereewatthanawut, I., Prapintip, S., Watchirarужи, K., Goto, M., Sasaki, M. & Shotipruk, A. (2008). Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technology* 99, 555-561.
- Ramachandraiaha, K., Koh, B., Davaatserenb, M. & Hong, G. (2017). Characterization of soy protein hydrolysates produced by varying subcritical water processing temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 43, 201-206.
- Prado, J. M., Lachos-Perez, D., Forster-Carneiro, T. & Rostagno, M. A. (2016). Sub- and supercritical water hydrolysis of agricultural and food industry residues for the production of fermentable sugars: A review. *Food and Bioproducts Processing* 98, 95-123.
- Brunner, G. (2009). Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids* 47, 373-381.
- Marshall, W. L. & Franck, E. U. (1981). Ion product of water substance, 0-1000 °C, 1-10,000 bars New International Formulation and its background. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 10(2), 295-304.
- Katritzky, A. R. & Allin, S. M. (1996). Aquathermolysis: Reactions of Organic Compounds with Superheated Water. *Accounts of Chemical Research* 29, 399-406.
- Brunner, G. (2014), *Hydrothermal and Supercritical Water Processes*, Hamburgo, Alemania: Elsevier.

- Llames, C. R. & Fontaine, J. (1994). Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 77, 1362-1402.
- Flores, J., Caballero, C. & Moreira, M. A. (2008). Una interpretación aproximativa del concepto de Hidrólisis en estructuras peptídicas en un Curso de Bioquímica del IPC en el contexto de la Teoría de los Campos Conceptuales de Vergnaud. *Revista de Investigación* 64, 135-159.
- Lin, R., Cheng, J., Ding, L., Song, W., Qi, F., Zhou, J. & Cen, K. (2015). Subcritical water hydrolysis of rice straw for reducing sugar production with focus on degradation by-products and kinetic analysis. *Bioresource Technology* 186, 8-14.
- Hill, R. L. & Schmidt, W. R. (1962). The Complete Enzymic Hydrolysis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 237(2), 389-396.
- Yang, W., Wang, H., Zhou, J. & Wu, S. (2018). *Hydrolysis kinetics and mechanism of chitin in subcritical water*. *The Journal of Supercritical Fluids* 135, 254-262.
- Cocero, M. J., Cabeza, A., Abad, N., Adamovic, T., Vaquerizo, L., Martínez, C. M. & Pazo-Cepeda, M. V. (2018). *The Journal of Supercritical Fluids* 133, 550-565.
- Cantero, D. A., Bermejo, M. D. & Cocero, M. J. (2013). High glucose selectivity in pressurized water hydrolysis of cellulose using ultra-fast reactors. *Bioresource Technology* 135, 697-703.
- Rogalinski, T., Liu, K., Albrecht, T. & Brunner, G. (2008). Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids* 46, 335-341.
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A. & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21, 35-51.
- Abdelmoez, W., Nakahasi, T. & Yoshida, H. (2007). Amino Acid Transformation and Decomposition in Saturated Subcritical Water Conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46, 5286-5294.
- Espinoza, A. D., Morawicki, R. O. & Hager, T. (2012). Hydrolysis of Whey Protein Isolate Using Subcritical Water. *Journal of Food Science* 71(1), C20-C26.
- Rogalinski, T., Herrmann, S. & Brunner, G. (2005). Production of amino acids from bovine serum albumin by continuous sub-critical water hydrolysis. *Journal of Supercritical Fluids* 46, 49-58.
- Espinoza, A. D. (2011). "Subcritical Water Hydrolysis of Whey Proteins. *Theses and Dissertations* 214.
- Andersson, E. & Holm, N. G. (2000). The Stability of some selected amino acids under attempted redox constrained hydrothermal conditions. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 30, 9-23.
- Velez, A. R. (2012). Ingeniería del Equilibrio entre Fases de Procesos de Producción de Biodiesel (tesis doctoral). Universidad Nacional del Sur, Buenos Aires, Argentina.

- Mufari, J. R. (2011). Determinación y cuantificación de proteínas solubles y de aminoácidos totales en harina de Quinoa (tesis de grado). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Alaiz, M., Girón, J., Hidalgo, F. J., Maza, M. P., Millán, F., Zamora, R. & Vioque, E. (1989). Esterification of amino acids as their 2,2-Bis(ethoxy-carbonyl) vinyl derivatives. *Synthesis* 7, 544-547.
- Fogler, H. S. (2008), *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*, México DF, México: Pearson Educación.
- Levenspiel, O. (2004), *Ingeniería de las reacciones químicas*, México DF, México: Limusa Wiley.
- Hendricks, R. C., Simoneu, R. J. & Smith, R. V. (1970). Survey of heat transfer to near-critical fluids. *NASA Technical note TN D-5886*.
- Sato, N., Quitain, A. T., Kang, K., Daimon, H. & Fujie, K. (2004). Reaction Kinetics of Amino Acid Decomposition in High-Temperature and High-Pressure Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 43, 3217-3222.
- U.S. Department of Commerce. National Institute of Standards and Technology: *Chemistry WebBook*. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Incropera, F. P. & DeWitt, D. P. (1999), *Fundamentos de transferencia de calor*, México DF, México: Pearson Educación.
- Singh, R. P., Heldman, D. R. (2001), *Introducción a la ingeniería de los alimentos*, Zaragoza, España: Acribia, S. A.
- Mills, A. F. (1991), *Transferencia de calor*, Los Ángeles, EEUU: McGraw-Hill.
- Lin, Y. S. & Akins, R. G. (1986). A Suggested characteristic dimension for natural convection in enclosures. *Chemical Engineering Communications* 49, 119-126.