



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA LIPASA EN LA
OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES USADOS, EMPLEANDO COMO REACTIVO ALCOHOL
METÍLICO**

AUTOR: LIC. JULYMAR MARCANO

TUTOR: DRA. NANCY SALINAS TREJO

VALENCIA, ENERO 2013



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA LIPASA EN LA
OBTENCION DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES USADOS, EMPLEANDO COMO REACTIVO ALCOHOL
METÍLICO**

AUTOR: JULYMAR MARCANO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO ANTE EL ÁREA DE ESTUDIOS DE
POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO PARA OPTAR AL
TITULO DE MAGISTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

VALENCIA, ENERO 2013

Este trabajo está dedicado con todo mi Amor a: Dios Todopoderoso, mi madre querida y mi amado esposo!

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios todopoderoso por siempre inspirarme en cada una de las metas trazadas.
- ❖ A mis padres y familiares por estar siempre presente en todo momento.
- ❖ A mis amigos por ser parte fundamental de mi vida.
- ❖ A mi tutora Nancy por darme siempre su apoyo incondicional en cada paso de mi vida, tanto en lo académico como en lo personal.
- ❖ A la Universidad de Carabobo por siempre abrirme sus puertas.
- ❖ A la Facultad de Ingeniería de la UC y a los profesores del Postgrado por brindarme sus conocimientos y experiencias.
- ❖ A la Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología a través del Departamento de Química, por apoyarme en el desarrollo experimental de este trabajo de investigación, específicamente al Laboratorio de Alimentos.
- ❖ Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fonacit) por el apoyo económico prestado para la realización de este trabajo de investigación a través de financiamiento del Proyecto PEI 2012000082.
- ❖ A todas las personas que han puesto un granito de arena en la realización de este gran sueño.

INDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|--|---------------|
| Índice Figuras | viii |
| Índice de Tablas | ix |
| Resumen | x |
| Introducción | 11 |
| Capítulo I El Problema | |
| 1.1 El Problema | 13 |
| 1.2 Objetivos | 17 |
| 1.3 Justificación | 18 |
| Capítulo II Marco Teórico | |
| 2.1 Antecedentes | 20 |
| 2.2 Fundamentos Teóricos | 24 |
| 2.2.1 Biodiesel | 24 |
| 2.2.2 Producción de Biodiesel a partir de aceite vegetal | 25 |
| 2.2.3 Transesterificación de aceites vegetales | 26 |
| 2.2.4 Factores que afectan el proceso de transesterificación | 27 |
| 2.2.4.1 Temperatura de reacción | 27 |
| 2.2.4.2 Relación molar alcohol : aceite vegetal | 27 |
| 2.2.4.3 Tipo de alcohol | 28 |
| 2.2.4.3.1 Metanol como materia prima para la obtención del biodiesel | 29 |
| 2.2.4.4 Solventes | 31 |
| 2.2.4.5 Tipo de biocatalizador | 32 |
| 2.2.4.5.1 Enzimas y biodiesel | 32 |
| 2.2.4.5.2 Lipasas en la obtención del biodiesel | 33 |
| 2.2.4.6 Concentración del biocatalizador | 35 |
| 2.2.4.7 Tiempo de reacción | 35 |
| 2.2.4.8 Intensidad de mezclado | 35 |
| 2.2.5 Normas de calidad para la evaluación del biodiesel | 36 |
| Capítulo III Marco Metodológico | |
| 3.1 Tipo y diseño de la investigación | 38 |
| 3.2 Población y muestra | 38 |
| 3.3 Tipo de muestreo | 38 |
| 3.4 Encuestas | 39 |
| 3.5 Procedimientos técnicos | 39 |
| 3.5.1 Caracterización del aceite de fritura usado | 39 |
| 3.5.2 Obtención del biodiesel a partir del aceite de fritura usado, vía catálisis enzimática | 41 |

| Contenido | Página |
|---|---------------|
| 3.5.3 Determinación de las propiedades características del biodiesel obtenido | 46 |
| Capítulo IV Resultados y Discusión | |
| 4.1 Encuestas | 48 |
| 4.2 Caracterización de la matriz grasa | 53 |
| 4.3 Obtención de biodiesel vía catálisis enzimática | 56 |
| 4.4 Características y propiedades del biodiesel obtenido | 61 |
| 4.5 Estimación del costo del biodiesel obtenido | 65 |
| Conclusiones y Recomendaciones | 67 |
| Referencias bibliográficas | 69 |
| Apéndices | 77 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | | Pág. |
|---------------|--|-------------|
| 2.1 | Transesterificación de triacilglicéridos con metanol | 30 |
| 2.2 | Tres reacciones consecutivas reversibles durante la transesterificación | 30 |
| 2.3 | Interesterificación de triacilgliceridos con acetato de metilo | 30 |
| 2.4 | Interesterificación de FFA con metanol | 31 |
| 3.1 | Influencia de la temperatura en la actividad de la Lipozyme CALB L | 42 |
| 3.2 | Montaje de la reacción de transesterificación | 45 |
| 4.1 | Cantidad de días laborados por los comerciantes del sector “El Palito” Parroquia Juan José Mora | 48 |
| 4.2 | Alimentos elaborados por los comerciantes del sector “El Palito” parroquia Juan José Mora, Puerto Cabello Edo. Carabobo | 49 |
| 4.3 | Tipo de grasa empleada por los comerciantes que laboran en “El Palito” | 50 |
| 4.4 | Cantidad de grasa empleada por los comerciantes del sector Juan José Mora “El Palito” | 51 |
| 4.5 | Cantidad de veces en la cual los comerciantes del “El Palito” añaden grasa para seguir realizando el proceso de fritura | 51 |
| 4.6 | Modo de disposición final de la grasa empleada por los comerciantes del sector Juan José Mora de “El Palito” | 52 |
| 4.7 | Conocimiento del daño ambiental por parte de la comunidad | 53 |
| 4.8 | Cromatograma de una muestra de biodiesel obtenido luego de la transesterificación del aceite vegetal usado con Lipozyme CALB L | 56 |
| 4.9 | Diagrama de pareto de los efectos estandarizados y sus interacciones sobre el rendimiento de la reacción de la reacción de obtención de biodiesel a partir de aceite vegetal usado | 58 |
| 4.10 | Efectos principales que afectan el rendimiento de la reacción de obtención de Biodiesel a partir de aceite vegetal usado | 59 |
| 4.11 | Viscosidad cinemática del biodiesel obtenido | 61 |
| 4.12 | Densidad obtenida para el biodiesel | 62 |
| 4.13 | Espectrograma infrarrojo con transformada de Fourier de los esteres metílicos elaborados a partir de aceite vegetal usado empleado como catalizador Lipozyme CALB L | 64 |

INDICE DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 2.1 | Comparación de la tecnología enzimática versus la tecnología química (ácida y alcalina) para la producción de biodiesel | 34 |
| 2.2 | Estándares americanos y europeos para la regulación de biodiesel | 37 |
| 3.1 | Diseño factorial 2^3 utilizado para el análisis del proceso de producción de biodiesel vía catálisis enzimática | 43 |
| 3.2 | Matriz de experimentos para la realización del diseño factorial 2^3 para la elaboración de biodiesel vía catálisis enzimática | 44 |
| 4.1 | Propiedades fisicoquímicas del aceite de vegetal usado | 54 |
| 4.2 | Perfil lipídico del aceite vegetal usado | 55 |
| 4.3 | Cantidad de ácido linoléico y porcentaje de rendimiento obtenido en las reacciones de transesterificación | 57 |
| 4.4 | Análisis ANOVA obtenido para el diseño de experimento de obtención de Biodiesel a partir de aceite vegetal usado por vía enzimática | 58 |
| 4.5 | Costos de la materia prima para la producción de biodiesel a partir de aceite de fritura usado empleando Lipozyme Calb L como catalizador | 65 |



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA LIPASA EN LA
OBTENCION DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES USADOS, EMPLEANDO COMO REACTIVO ALCOHOL
METÍLICO**

AUTOR: JULYMAR MARCANO L

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo de investigación, era evaluar el comportamiento de la enzima del tipo lipasa (Lipozyme Calb L) en la obtención de biodiesel (biocombustible conformado por ésteres metílicos de ácidos grasos) a partir de aceites de frituras usados, empleando alcohol metílico como solvente, a través de una reacción de transesterificación. El aceite de fritura empleado se recolectó de las actividades comerciales de los establecimientos de comida rápida ubicados en El Palito, Parroquia Juan José Mora, Puerto Cabello Edo. Carabobo. A través de un diseño factorial del tipo 2^3 , se estudió como influían diversas variables en el rendimiento de la obtención del biodiesel, dichas variable fueron: cantidad de enzima, relación molar aceite:alcohol y tiempo de reacción. De acuerdo a los resultados obtenidos se tiene que el tiempo y la cantidad de enzima tienen un efecto significativo en la obtención del biodiesel a un 95% de confianza, siendo la cantidad de enzima el factor con mayor influencia sobre la variable respuesta, dichos resultados se obtuvieron empleando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI. Las mejores condiciones de operación se obtuvieron trabajando con 10% de enzima y dos horas de reacción. Finalmente se puede concluir que es posible utilizar dicho residuo graso para la obtención de biocombustible con un catalizador de tipo enzimático, presentando esto una fuente de energía ambientalmente sustentable.

INTRODUCCION

Muchos de los desechos orgánicos no tienen un tratamiento adecuado o la búsqueda de su mejor uso representa altos costos. La mayor parte de los desechos domésticos no son reciclados, siendo depositados en rellenos sanitarios donde ocupan grandes espacios o entran al medio ambiente como un contaminante de aguas, suelos y atmósfera, debido a sus grandes volúmenes. Un ejemplo de eso son las grasas desechadas por industrias alimenticias, restaurantes o viviendas. Esas grasas de desecho representan un contaminante muy problemático, debido a su composición lipídica, altos costos para tratarlos y elevados volúmenes que se desechan (Días *et al.*, 2007).

En muchos países se consumen grandes volúmenes de aceites vegetales, lo que genera a su vez grandes cantidades de desechos orgánicos. Estos desechos, por sus características químicas, presentan altos potenciales energéticos. Gran parte de estos aceites vegetales son descartados en rellenos sanitarios, sin aprovecharlos como fuente de energía. Recientemente, se empezó a darles uso en la producción de biodiesel o para el suplemento en la alimentación de animales. Según Días *et al.* (2007), la grasa vegetal posee un alto potencial energético debido a su composición química y alto contenido de lípidos degradables por bacterias anaeróbicas.

Convencionalmente el biodiesel se produce utilizando catalizadores básicos (Meher *et al.*, 2006), los cuales presentan problemas de recuperación del catalizador y corrosión. Por otra parte, la catálisis enzimática se ha explorado recientemente con buenos resultados (Al-Zuhair, 2005; Dizge y Keskinler, 2008; Du, 2005; Royon *et al.*, 2007); demostrando ser un sistema que proporciona grandes ventajas en el proceso como: mayor seguridad, pueden

ser usadas materias primas de menor calidad, el producto y subproducto se obtienen con mayor grado de pureza y los procesos enzimáticos son generalmente más limpios y ecológicos.

CAPÍTULO I

1.1 PROBLEMA

El crecimiento de la población mundial, la industrialización y el consumo creciente de recursos naturales están produciendo niveles de desechos cada vez más altos (Merino y O'Halon, 1990). Un ejemplo de estos desechos son los Aceites Vegetales Usados (AVU), provenientes de las industrias alimenticias, restaurantes o viviendas.

El aceite vegetal de uso doméstico, es un producto habitual en los hogares, restaurantes, catering, industrias alimenticias, los mismos son utilizados como materia prima (aceite de oliva, girasol, soja) para freír o durante procesos de cocción. Dichos aceites son grasas líquidas (ácidos grasos) de color verde oro, y viscosidad variable según su procedencia. Son sustancias de menor densidad que el agua, por lo que siempre flotan en su superficie, formando una capa que disminuye el paso de la luz e impide el intercambio de oxígeno entre el agua y el aire.

Durante el proceso de fritura, el aceite o grasa se expone a altas temperaturas en presencia de aire y humedad. En estas condiciones, puede sufrir cambios importantes debido a hidrólisis, reacciones de oxidación y térmica, lo que ocasiona la pérdida de la calidad del aceite de freír y de la fritura. Los cambios en los componentes de materias grasas principales son conocidos, aunque no es fácil predecir la tasa de aceite degradado debido al alto número de variables involucrados en el proceso de fritura. Algunos de ellos están vinculados con el propio proceso, tales como temperatura, tiempo de fritura, calentamiento continuo o discontinuo, volumen de aceite, etc., mientras que otros, a los alimentos sometidos a fritura, es decir, composición lipídica, y demás constituyentes menores, o bien a la grasa o el aceite usado por ejemplo, grado de insaturación, la calidad inicial y aditivos (Varela, 1985;

Rodríguez et al., 2007). Los nuevos productos formados durante la fritura son polímeros, dímeros, triglicéridos oxidados, así como diglicéridos y ácidos grasos (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2006).

La utilización continua de los aceites vegetales provoca que los mismos se carguen de componentes polares que son cancerígenos. La norma europea para la calidad de los aceites y grasas calentados (BOE, 1989), establece que los componentes polares no deben superar el 25%, por lo que el aceite se debe cambiar con frecuencia, generándose así un volumen representativo de este residuo graso. El AVU se considera un residuo contaminante, catalogado, según la Lista Europea de Residuos (BOE, 2002), como LER 20 01 25.

Los aceites vegetales usados suelen ser vertidos en las cloacales y desagües pluviales produciendo altos niveles de contaminación. Situación que es más grave en locales de comida donde se utilizan grandes cantidades de aceite.

Cuando el aceite es vertido al sistema cloacal este se adhiere a las paredes de las cañerías contribuyendo a la disminución de sus diámetros con la consecuente pérdida de rendimiento del sistema. Si el receptor final es un pozo absorbente, el aceite facilita la impermeabilización del mismo, es decir se tapan los poros y deja de funcionar; si el receptor final es un curso de agua como un arroyo o un río el residuo aportará una mayor carga orgánica, entonces el proceso de autodepuración consumirá mayor cantidad del oxígeno disponible en el agua, el mismo oxígeno que utilizan los peces que allí viven (Elías, 2012).

Los aceites usados vertidos al suelo producen la destrucción del humus y contaminación de aguas superficiales y subterráneas. En efecto, los hidrocarburos saturados que contiene el aceite usado no son degradables biológicamente, recubren las tierras de una película impermeable que destruye el humus vegetal y, por tanto, la fertilidad del suelo (Elías, 2012).

Un aumento de la conciencia de la contaminación ambiental crea el concepto de cero emisiones, el reciclaje de aceites vegetales usados, recientemente atrae considerable la atención como un problema social en todo el mundo. (Shimada, et al., 2002). En la actualidad son muchos los países cuyo compromiso ambiental ha ido cobrando fuerza hasta hacerse una realidad, instalándose sistemas para la adecuada gestión de los aceites vegetales usados de origen doméstico, un ejemplo de ellos son Argentina, Colombia, Brasil, Perú, Japón, Ecuador y los países Europeos. En estos países, el objetivo principal está en llevar a cabo la recolección del aceite vegetal usado, y darle un aprovechamiento adecuado (elaboración de biodiesel) además de concienciar a la población en la gestión del residuo.

En Venezuela actualmente, no existe un sistema de recolección de aceite vegetal usado, el aceite generalmente termina en el suelo o el agua a través de las redes cloacales. En el estado Carabobo, específicamente en el municipio Puerto Cabello, sector el Palito, parroquia Juan José Flores, existen un conjunto de establecimiento de comerciantes formales e informales (140 establecimientos aproximadamente), los cuales comercializan diariamente con alimentos fritos (arepas, empanadas, pescados, etc.), al final de la tarde el aceite usado para la preparación de dichos alimentos, se descarta. Muchos de ellos, lo envasan en recipientes de plástico y lo colocan en la basura común, otros esperan que la matriz grasa se enfríe y lo descartan en el suelo o en el río que está adyacente a la comunidad y otros sencillamente lo botan en la desagüe directamente.

El inadecuado manejo de los aceites usados, realizado en esta comunidad, sumado a la falta de conciencia y cultura ambiental de los habitantes del lugar, a la carencia de normativa técnica sobre el tema y a la falta de sistemas formales de almacenamiento, recolección y aprovechamiento del aceite usado, ocasiona, entre otros problemas, la contaminación del suelo, del agua superficial y subterránea, el deterioro de tuberías y alcantarillado y el incremento de los costos de operación y mantenimiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales de la zona.

Cabe destacar que la Normativa Ambiental venezolana reporta como máximo 20mg/L, de aceites naturales vertidos en ríos y espacios naturales. También reporta que si el vertido es a un sistema municipal y posterior procesamiento, lo máximo sería 150mg/L. (Decreto 883, 1995).

Al analizar el impacto que podría ser ocasionado en el medio ambiente por los aceites vegetales usados, surge la necesidad de buscar alternativas para la reutilización de este residuo como una herramienta energética sostenible a largo plazo. La relevancia de emplear tecnologías y fuentes alternativas de recursos y energía radica en la contemplación de dos aspectos: minimización del impacto ambiental y capacidad de renovación (Díaz *et al.*, 2003). La obtención de energía renovable o biocombustibles a partir de la biomasa vegetal empleando una enzima lipasa y utilizando como reactivo alcohol metílico, fue el objetivo del presente trabajo de investigación.

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento de una enzima lipasa en la obtención de biocombustible a partir de aceites vegetales usados, empleando como reactivo alcohol metílico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el aceite usado en frituras.
- Obtener biodiesel mediante catálisis enzimática empleando una enzima lipasa (Lipozime CAL B).
- Comparar las características y propiedades del biodiesel obtenido con los estándares establecidos internacionalmente.
- Estimar el costo del biodiesel obtenido en el laboratorio mediante catálisis enzimática.

1.3 JUSTIFICACIÓN

El aceite de fritura usado es una de las alternativas con mejores perspectivas en la producción de biodiesel, ya que es la materia prima más económica, y con su utilización se evitan los costes de tratamiento como residuo. Además, como valor añadido, la utilización de aceites usados significa la buena gestión y uso del residuo.

El biodiesel elaborado a partir de aceite vegetal reduce la contaminación que genera el vertido de estos residuos en las cloacas y los desagües pluviales, permite la generación de combustible que puede utilizarse en motores diesel, con lo que reduce las emisiones de CO₂, además ofrece una actividad económica alternativa relacionada a la recolección del aceite vegetal usado y a su procesamiento posterior, a su vez no produce óxido de azufre y minimiza las partículas de hollín. Debido a estas ventajas ambientales, el biodiesel se puede emplear como un sustituto para el combustible diesel convencional. Los motores diesel de hoy requieren un combustible que sea limpio al quemarlo, además de permanecer estable bajo las distintas condiciones en las que opera.

El biodiesel es el único combustible alternativo que puede usarse directamente en cualquier motor diesel, sin ser necesario ningún tipo de modificación. Como sus propiedades son similares al combustible diesel de petróleo, se pueden mezclar ambos en cualquier proporción, sin ningún tipo de problema (Hilbert, 2007).

Con la realización de este trabajo se busca plantear una alternativa técnica, que sea amigable con el medio ambiente desde la evolución del desecho contaminante, hasta el producto obtenido a partir de su transformación en biocombustibles y glicerina entre otros.

Finalmente, el desarrollo de este trabajo de investigación es de gran importancia para la Universidad de Carabobo, ya que se estaría dentro de los estándares requeridos a nivel mundial, los cuales establecen el desarrollo de nuevos conocimiento en búsqueda de energías amigables con el ambiente. A su vez se estaría formando personal calificado de 4to nivel académico, contribuyendo así a promover la investigación en el país.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Se han realizado diversos trabajos relacionados con la presente investigación, los mismos se citan a continuación, ellos son de vital importancia para la construcción del marco teórico y metodológico de este trabajo de investigación.

Gog, A., Roman, M., Tos, M., Paizs, C. y Dan Irimie F. (2012). **Producción del biodiesel utilizando transesterificación enzimática- Estado actual y perspectivas**. El biodiesel ha atraído un considerable interés en los últimos años como una alternativa, biodegradable y combustible para el transporte no contaminante. El proceso convencional de catálisis alcalina para la producción de biodiesel consume mucha energía y genera subproductos indeseables tales como jabones, que hacen difícil la separación y la purificación del biodiesel. Se ha prestado especial atención al uso de lipasas como biocatalizadores para la producción de biodiesel, debido a que se emplean condiciones suaves y el proceso de purificación del biodiesel y subproductos es relativamente sencillo. Sin embargo, comparando los procesos de catálisis química convencional, los principales obstáculos para la producción biodiesel por vía enzimática son; el costo de lipasas, la velocidad de reacción relativamente lenta y la inactivación de las enzimas lipasas causada por metanol y glicerol. Esta revisión evaluó el estado actual y las perspectivas para la producción de biodiesel vía enzimática e indica a su vez las principales variables operacionales que influyen en la actividad de las lipasas y en la estabilidad de la mismas, dando un conjunto de soluciones tecnológicas para la aplicación industrial de un proceso enzimático.

Este antecedente es de importancia ya que es una revisión reciente de todo lo relacionado a la producción de biodiesel vía enzimática, a su vez proporciona variables a controlar durante el proceso para aumentar la actividad de la enzimática.

Meng, L. y Salihon J. (2011). **Conversión de aceite de palma a etil y metil ester usando enzimas crudas.** El biodiesel (ésteres metílicos) es un combustible alternativo limpio que puede ser producido a partir de muchos recursos renovables. El aceite de palma como otros aceites vegetales se puede utilizar como materia prima para la producción de biodiesel. Las reacciones enzimáticas catalizadas por lipasas son potencialmente excelentes procesos para producir biodiesel a través de la reacción de transesterificación. Las enzimas tienen varias ventajas sobre catalizadores químicos, como las condiciones suaves de reacción una alta especificidad y capacidad de renovación. Diversos microorganismos como bacterias y hongos producen diferentes tipos de enzimas que podrían ser utilizados como catalizadores en una serie de reacciones de degradación. La transesterificación enzimática de aceite de palma crudo con metanol fue estudiada en esta investigación. El rendimiento en la obtención de biodiesel se evaluó cambiando la relación molar alcohol:aceite de palma crudo y la temperatura de reacción. La relación molar metanol:aceite de palma crudo se varió en el intervalo de 3:1 a 4:1, mientras que la temperatura de reacción en el intervalo de 35°C a 60°C. Se encontró que la proporción óptima de metanol:aceite de palma crudo es de 3:1 y la temperatura de reacción óptima es 40°C.

Esta investigación se considera relevante, ya que proporciona información acerca de la metodología a seguir para la obtención del biodiesel,

específicamente en la selección de la relación molar metanol/aceite y la temperatura de reacción, lo cual es vital para la optimización del proceso.

Lafont, J., Páez, M. y Torres, Y. (2011). **Análisis Químico de Mezclas Biodiesel de Aceite de Cocina Usado y Diesel por Espectroscopía Infrarroja**. Propusieron un método eficiente para determinar los porcentajes óptimos de mezclas biodiesel de aceite usado y diesel, para uso automotor. El procedimiento consistió en la recolección del aceite usado, limpieza de residuos, y obtención del biodiesel mediante una reacción de transesterificación, con diferentes proporciones molares metanol/aceite. Las muestras fueron analizadas por espectroscopía infrarroja. Se encontró que una proporción metanol/aceite de 1:8 presentó mayor rendimiento en la obtención de biodiesel. Los espectros de infrarrojo mostraron el incremento del máximo de carbonilo de los ésteres metílicos al aumentar las concentraciones de biodiesel en las mezcla biodiesel-diesel. Se concluye que la técnica usada cumple con la ley de Lambert-Beer y es adecuada para cuantificar este tipo de mezclas.

Este trabajo ayudara a encontrar de igual manera las relaciones de metanol/aceite necesarias con las que se debe trabajar para obtener un elevado grado de conversión en la reacción y así obtener un biodiesel de mejor calidad, así como también explica como emplear la espectroscopía infrarroja para caracterizar el biodiesel obtenido.

Otero, C., Dave, Baeza, R., González, J. y López, L. (2010) **Producción enzimática de biodiesel a partir de aceites residuales**. La investigación tenía como finalidad la producción enzimática de biodiesel a partir de aceites residuales. El aceite usado fue calentado a 60°C y luego filtrado para la separación de los posibles residuos sólidos. La enzima empleada para la

síntesis de biodiesel (Novozyme 435), fue suministrada por Novozyme Ltd. La metodología que emplearon los autores fue la siguiente: en un reactor de 25 mL se colocó el aceite tratado y metanol en exceso (1:6, w/w), y se añade hexadecano como patrón interno (100 L/g de mezcla). La reacción se lleva a cabo a 30°C y 200 rpm y se añadió la enzima. Posteriormente, se evaluaron diferentes relaciones de mezcla de reacción en las condiciones anteriormente descritas, alcanzando el 100% de conversión con la relación 6:1 (alcohol: aceite) tras 4h de reacción. De acuerdo a lo establecido por los autores, las ventajas de la tecnología enzimática, son muchas entre ellas se pueden mencionar: poca o nula generación de subproductos, reducción de etapas de purificación, aumento de la rentabilidad económica del proceso; no se generan aguas residuales alcalinas, condiciones de reacción “suaves” (temperatura y presión), reducción de los requerimientos energéticos del proceso, recuperación y reutilización de la enzima.

Las reacciones enzimáticas no se ven afectadas de forma importante por la presencia de ácidos grasos libres y agua en el medio de reacción a concentraciones no excesivamente elevadas, lo que permite procesar materias primas con cierto grado de acidez e hidratación, como por ejemplo aceites y grasas residuales, permitiendo reducir los costos de producción de forma importante y por tanto disminuir el precio de venta del biodiesel formado.

Este antecedente proporciona información de gran importancia a la hora de llevar a cabo la recuperación del aceite de fritura usado, haciendo uso de la catálisis enzimática, debido a que se establecen parámetros de reacción (temperatura, tiempo de reacción, relación alcohol: aceite) para obtener una mayor conversión catalítica.

Guerrero M. y Seijas N. (2008) **Evaluación del proceso de obtención de biodiesel vía catálisis homogénea y heterogénea a partir de un aceite de desecho, como alternativa tecnológica para la protección ambiental.** El objetivo fundamental del trabajo fue proporcionar una alternativa para minimizar el impacto ambiental producido por el vertido de aceite vegetales de desecho. Se empleó oleína de palma utilizada en proceso de fritura en profundidad, evaluándose la producción de biodiesel vía catálisis homogénea y heterogénea. De los resultados más relevantes, se obtuvo que la cantidad de catalizador fue el factor más significativo en el rendimiento de las reacciones de transesterificación vía catálisis homogénea y heterogénea. A su vez, la zeolita tipo “Y” presentó mayor actividad catalítica respecto a la hidrotalcita y la catálisis heterogénea constituyó la alternativa tecnológica que mejor se adaptó a las necesidades de preservación del medio ambiente.

Este antecedente es de gran importancia para la investigación puesto que contribuye a establecer comparaciones en cuanto a otras técnicas de obtención de biodiesel, además constituye una herramienta fundamental para la elaboración del marco teórico y metodológico del trabajo.

2.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.2.1 BIODIESEL

El biodiesel es definido por la ASTM (American Society for Testing and Materials) como un combustible conformado por monoalquilésteres de ácidos grasos de cadena larga derivado de aceites vegetales o grasas animales (Cerveró et al., 2008) (www.astm.org). En los últimos treinta años este biocombustible ha tenido un auge en su utilización sobre el diesel fósil tradicional debido a los problemas de encarecimiento y contaminación que genera este último.

Este biocombustible ofrece ventajas medioambientales, energéticas (aporta el triple de energía de la que se necesita para su producción) y económicas frente a los combustibles tradicionales, y se considera indispensable en la lucha contra el cambio climático (Rojas, et al, 2010).

2.2.2 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE VEGETAL

Una opción llamativa es la producción del biodiesel a partir de aceites de fritura usado. Dicha alternativa permite utilizar materia prima de más bajo costo que los aceites refinados y, a la vez, facilita la disposición final de un residuo con alto potencial contaminante. Este esquema de producción de biodiesel ha llegado a desarrollarse industrialmente en países que cuentan con legislaciones adecuadas sobre la disposición final de los aceites vegetales usados y en los que existen empresas con experiencia de gestión en su recolección (Bejumean, et al., 2009).

Se debe tener en cuenta que la fritura es un proceso físico-químico complejo que puede afectar significativamente la composición química del aceite original. Las condiciones en la que se desarrolle el proceso pueden promover reacciones de diversos tipos, como: hidrólisis (formación de ácidos grasos libres, glicerol libre y mono y diglicéridos), oxidación (formación inicial de hidroperóxidos y posteriormente de aldehídos, cetonas, hidrocarburos, alcoholes, entre otros) y polimerización (formación de dímeros o polímeros a partir de radicales libres provenientes de los enlaces dobles de los ácidos grasos). La mayoría de los compuestos formados por las reacciones mencionadas son de naturaleza polar y se pueden retirar del aceite de fritura usado mediante adsorción con sólidos porosos naturales o sintéticos (Bejumean, et al., 2009).

2.2.3 TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITES VEGETALES

El método más extendido para producir monoalquilésteres a partir de las grasas y aceites de origen natural, es la reacción de transesterificación, la cual consiste en hacer reaccionar los triglicéridos de las grasas y aceites naturales con un alcohol, y producir ésteres lineales de bajo peso molecular; estos nuevos ésteres presentan propiedades físicas muy similares al combustible diesel fósil. A nivel industrial el alcohol más utilizado para la transesterificación de los triglicéridos es el metanol, pero puede darse también con otros alcoholes lineales (etanol, propanol, butanol, etc.) y obtener resultados similares. Un subproducto de la reacción de transesterificación es el glicerol, un alcohol ramificado de gran utilización a nivel industrial (Zapata, et al, 2003).

La reacción de transesterificación debe ser catalizada para disminuir el tiempo de reacción y para esto se pueden usar un variado número de compuestos como bases (KOH, NaOH), ácidos (HCl, H₂SO₄), y muy recientemente, enzimas naturales (Lipasas) (Zapata, et. al., 2003). Los catalizadores más utilizados a nivel industrial son las bases, ya que ofrecen cortos tiempos de reacción con rendimientos aceptables y tecnología económica. La transesterificación es una reacción reversible y para dirigirla hacia los productos se agrega alcohol en exceso (Meher, et al, 2006). El exceso de alcohol que ha de adicionarse, así como la concentración del catalizador a utilizar, y la temperatura y tiempo de reacción, son condiciones que hay que establecer experimentalmente para cada tipo de aceite (triglicérido) a utilizar.

El propósito principal del proceso de la transesterificación es el de reducir la viscosidad del aceite para mejorar sus características carburantes y de flujo (Rojas, et al., 2010)

2.2.4 FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN

La alcoholólisis de aceites vegetales depende de la temperatura y tiempo de reacción, relación molar alcohol:aceite vegetal, tipo de alcohol, tipo y concentración de catalizador, intensidad del mezclado y contenido de ácidos grasos libres (AGL) y humedad. Sin embargo, cuando se utilizan lipasas se deben considerar otras variables como: tipo de solvente, pH del medio reactante, microorganismo que genera la enzima y estado libre o inmovilizado de la enzima. A continuación se analizan los efectos de las condiciones de operación en la transesterificación de aceites vegetales sobre el rendimiento de la reacción, reportados en la literatura. (Rojas, et al, 2010)

2.2.4.1 Temperatura de reacción. En los procesos biocatalíticos la temperatura de reacción es más baja que la utilizada en catálisis inorgánica, debido a que las altas temperaturas desnaturalizan las enzimas, evaporan el solvente cuando éste es utilizado en la reacción y favorece la reacción de hidrólisis. El rango de temperatura más utilizado en la catálisis enzimática está entre 35-50°C. Sin embargo, se ha reportado un rendimiento del 90% utilizando una temperatura de 60°C al transesterificar aceite de semillas de algodón con *Cándida antártica* en estado libre. Se ha encontrado que el rendimiento al transesterificar aceite de girasol con *R. miehei*, a temperaturas de 35, 40 y 45°C, alcanza valores de 37, 43 y 63%, respectivamente. Esto muestra que al aumentar la temperatura de reacción, dentro del rango limitado por la enzima, el rendimiento aumenta (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.2 Relación molar alcohol:aceite vegetal. Por la estequiometría de la reacción se requiere una relación molar alcohol:aceite de 3:1, la cual se debe mantener en la catálisis enzimática, pero como la alcoholólisis es

reversible, se necesita alimentar un exceso de alcohol para favorecer la reacción directa. Se ha reportado que aun con la cantidad estequiométrica de alcohol, la enzima se inhibe así esté inmovilizada. Hay enzimas que soportan mayor concentración de alcohol que otras, como la *P. fluorescens*, que mantiene su actividad hasta una relación de 4.5:1. Eso se debe a que en algunas cepas de la *Pseudomona* los ácidos grasos insaturados de la membrana celular se isomerizan de cis a trans haciéndola más tolerante a solventes orgánicos. Para evitar la inhibición de las enzimas por el alcohol, éste se adiciona a diversos tiempos durante la reacción, como es el caso donde se realizan tres adiciones sucesivas de 1/3 del equivalente molar del alcohol (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.3 Tipo de alcohol. El rendimiento de la reacción depende del alcohol y la lipasa utilizada. Se ha reportado que la lipasa de *M. miehei* es más eficiente con alcoholes primarios, mientras que la lipasa de *C. antártica* lo es con alcoholes secundarios. También se ha encontrado que en la etanólisis de aceite de soya con *P. cepacia* inmovilizada el rendimiento es del 65% y con metanol del 47%. Resultados similares se lograron con aceite de soya y *M. miehei*, y aceite de girasol y *P. cepacia*. Esto se debe a que algunas lipasas son más eficientes con alcoholes de cadena larga que con alcoholes de cadena corta. Sin embargo, se ha establecido que el rendimiento de la alcoholólisis de aceite de jatrofa con *R. orizae* inmovilizada es mayor con metanol que con etanol. Esto se atribuye al bajo peso molecular y la alta polaridad del metanol, pues estas características permiten un mayor contacto con la enzima debido al aumento en la velocidad de difusión a través de la membrana celular (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.3.1 Metanol como materia prima en la obtención del biodiesel

La producción de biodiesel a base de aceite y metanol se muestra en la Figura 2.1. Es evidente que un mol de triglicérido reacciona con 3 moles de metanol para producir 3 moles del éster metílico y 1 mol glicerol. Investigaciones adicionales indican que el diglicérido y monoglicérido se detectan como productos intermedios durante la reacción de transesterificación catalizada por KOH (Vicente, et al, 2006 y Komers, et al, 2002) y NaOH (Cao, et al, 2009 y Stiefel, 2009). La reacción global se puede dividir en tres reacciones consecutivas reversibles (i) una molécula de triglicéridos en primer lugar reacciona con metanol para producir una molécula de metil éster y un diglicérido (ii) el diglicérido producido luego reacciona con una molécula de metanol para producir el monoglicérido y un éster de metilo y (iii) el monoglicérido además reacciona con metanol para producir metil éster y glicerol (Figura 2.2). El Biodiesel obtenido a través de la transesterificación enzimática con acetato de metilo (Figura 2.3) también sigue el mecanismo cinético de las tres reacciones reversibles consecutivas. Además, la medición de ácidos grasos libres en la transesterificación enzimática muestra que su contenido aumenta inicialmente y luego desciende (Tan, et al, 2006), lo que sugiere que en cada reacción reversible consecutiva que se muestra en la Figura 2.2, los triglicéridos/diglicérido/monoglicérido se hidrolizan primero a ácidos grasos libres, y luego se convierte en ésteres metílicos de dichos ácidos a través de la interesterificación (Figura 2.4).

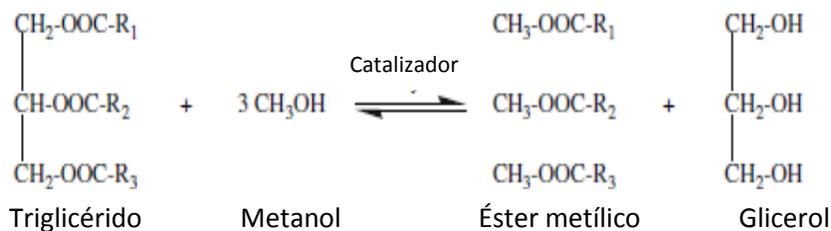


Figura 2.1 Transesterificación de triacilglicéridos con metanol

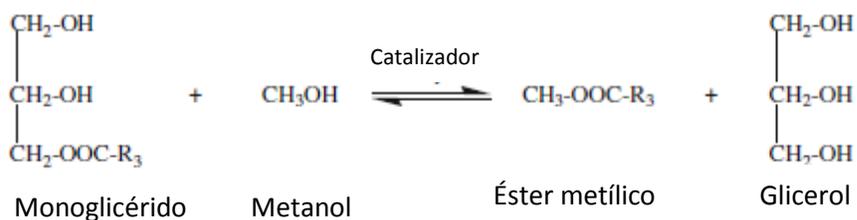
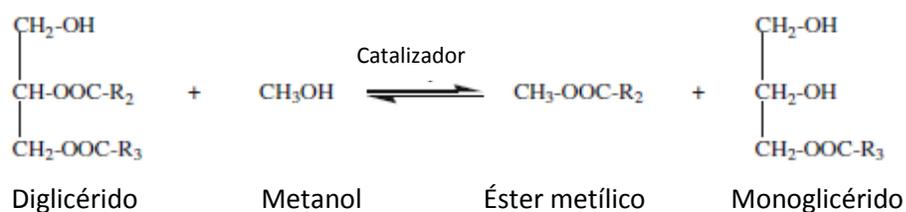
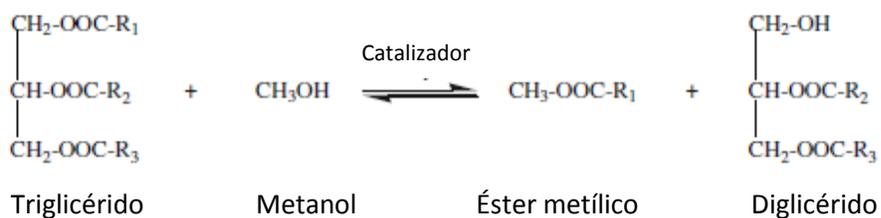


Figura 2.2 Tres reacciones consecutivas reversibles durante la transesterificación

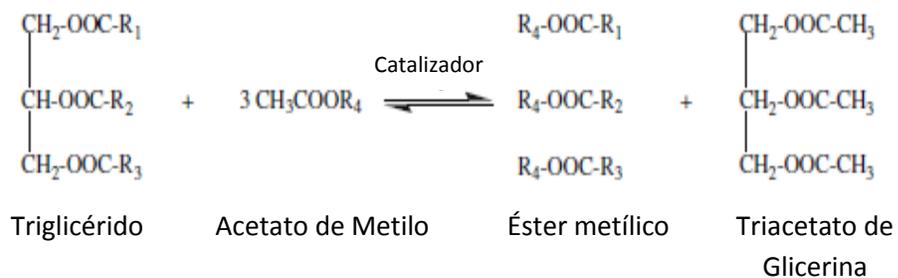


Figura 2.3 Interesterificación de triacilglicéridos con acetato de metilo

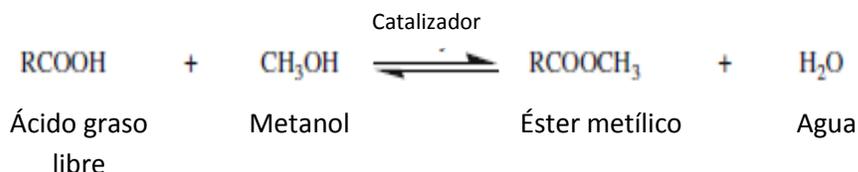


Figura 2.4 Interesterificación de FFA con metanol

La elección del alcohol está generalmente relacionada con factores económicos y aspectos técnicos del proceso de producción, como la facilidad de separación de esteres y de glicerina. Los más utilizados son el metanol y el etanol, aunque otros alcoholes como el isopropanol y butílico también pueden ser utilizados. El metanol presenta ventajas sobre el etanol, destacando: i) requiere menor cantidad de alcohol en exceso; ii) posee mayor eficiencia de conversión de aceites; iii) requiere menores temperaturas de reacción; iv) posee menor tiempo de reacción; v) separación de fases más fácil y vi) recuperación más fácil (Tan, et al, 2006)

2.2.4.4 Solvente. En la catálisis enzimática se presentan dificultades como la baja solubilidad del alcohol con los demás componentes de la reacción y el recubrimiento de la enzima por la glicerina. Para evitar estos inconvenientes se utilizan solventes como hexano, terbutanol, octano, acetona y éter de petróleo. En la alcoholólisis de aceite de *Madhuca indica* con *P. cepacia* libre utilizando octano como solvente se alcanzó un rendimiento del 84%, mientras que sin solvente fue del 80%. Al evaluar el rendimiento de la transesterificación del aceite de girasol con *R. miehei*, utilizando diversos tipos de solventes, se encontró que al utilizar enzimas inmovilizadas se obtienen mayores rendimientos con solventes no polares, lo cual se debe a que dichos solventes no retiran el agua esencial de las enzimas, prolongando su actividad catalítica. Algunas lipasas, como la *R. miehei*, *T. lanuginosa* y *P.*

fluorescens, se ven inhibidas al utilizar solventes orgánicos polares, como la acetona. Aunque el rendimiento de la alcoholisis aumenta al utilizar solventes, también lo hacen los costos de producción al recuperar y purificar el solvente (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.5 Tipo de biocatalizador. Las lipasas utilizadas se producen de forma extra o intracelular. Las primeras requieren de métodos de purificación para su obtención, elevando sus costos en el mercado. Debido a esto, se han desarrollado métodos para su inmovilización, incrementando su eficiencia y reutilización en nuevas reacciones. Se ha encontrado que en la alcoholisis de aceite de jatrofa con *P. cepacia* se alcanzan rendimientos del 63 y 79% en 24 h, mientras que en la metanolisis de aceite de soya, con esta misma lipasa, las conversiones son de 41 y 65% mol en 1 h cuando la lipasa se encuentra libre e inmovilizada, respectivamente. Esto quiere decir que el rendimiento de la reacción aumenta al inmovilizar la enzima debido a la protección que brinda el soporte a los cambios del microambiente de la reacción (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.5.1 Enzimas y biodiesel

Un desarrollo relativamente nuevo y prometedor es la producción del biodiesel a través de transesterificación enzimática con lipasa como el biocatalizador. En comparación con los catalizadores de base y ácido, las lipasas tienen ventajas importantes: (i) la transesterificación y esterificación puede ser catalizada por lipasas simultáneamente a temperaturas entre 40 y 70°C, esto indica que el aceite de desecho que contiene alto contenido de ácidos grasos libres se puede utilizar como materia prima en la síntesis de biodiésel, y el consumo de energía sería baja, debido a la baja temperatura de reacción; (ii) ninguna formación de jabón se produce durante la reacción, lo que simplifica la separación y purificación del biodiesel y glicerol; (iii) las lipasas pueden ser fácilmente biodegradables, lo cual reduce

considerablemente cualquier contaminación ambiental potencial; (iv) las lipasas no son corrosivas para la planta de producción; (v) las lipasas inmovilizadas pueden ser simplemente separadas y reutilizadas con una elevada actividad catalítica.

Las enzimas se utilizan en forma libre o inmovilizada en la transesterificación. Las enzimas libres se agregan directamente al medio reactante; pero debido al contacto directo con el alcohol se reduce su actividad catalítica y se dificulta su recuperación al final del proceso. Las enzimas inmovilizadas hacen referencia a las lipasas que se adhieren o confinan en partículas sólidas (soportes de inmovilización), con el propósito de mantener su actividad catalítica y posibilitar su reutilización. Entre los soportes de inmovilización más utilizados se encuentran: espumas de poliuretano reticulado, zeolitas, soportes de polipropileno, resinas de intercambio iónico, y filosilicato sol-gel (Rojas, et al., 2010)

2.2.4.5.2 LIPASAS EN LA OBTECIÓN DEL BIODIESEL

Las lipasas tienen una excelente actividad catalítica y la estabilidad en medios no acuosos y su especificidad, regioselectividad y la enantioselectividad puede ser utilizado con éxito para muchas aplicaciones en la síntesis orgánica, incluida la resolución cinética y síntesis asimétrica. En la última década, se ha prestado especial dedicado a la utilización de lipasas como biocatalizadores para la producción de biodiesel. Los pros y los contras del uso de lipasas como biocatalizadores en comparación con los catalizadores alcalinos y ácidos, para la producción de biodiesel se resumen en la Tabla 2.1. (Gog, et al., 2012)

Tabla 2.1 Comparación de la tecnología enzimática versus la tecnología química (ácida y alcalina) para la producción de biodiesel

| Parámetro | Proceso Enzimático | Proceso Químico | |
|--|--|---|---|
| | | Proceso Alcalino | Proceso Ácido |
| Contenido de AGL (Ácidos Grasos Libres) en la materia prima | Los AGL se convierten en Biodiesel | Formación de jabón. | Los AGL se convierten en Biodiesel |
| Contenido de agua en la materia prima | Es perjudicial para la lipasa | Formación de jabón, la hidrólisis del aceite da como resultado una mayor cantidad de jabón | Desactivación del catalizador |
| Producción del Biodiesel | Alto rendimiento, alrededor del 90% | Alto rendimiento, mayor al 96% | Alto rendimiento (> 90%) empleando una alta relación molar alcohol y de aceite, alta concentración de catalizador y elevadas temperaturas |
| Tiempo de reacción | Corto Tiempo entre: 0,5 y 10h | Largo Tiempo entre: 2h y 24h | Más lento que el proceso alcalino |
| Recuperación del Glicerol | Fácil, glicerol de alto grado | Complejo, glicerol de bajo grado | Complejo, glicerol de bajo grado |
| Recuperación del catalizador y reutilización | Fácil La reutilización ha sido probada pero no suficientemente estudiada. | Difícil, neutralizado con un ácido Parcialmente perdido en la etapa de post-procesamiento. | Difícil, el catalizador termina en los subproductos Catalizador no reutilizable |
| Costos de energía | Bajo Temperaturas entre: 20-50°C | Medio Temperaturas entre: 60-80°C | Alto Temperaturas superiores a 100°C |
| Costo del catalizador | Alto | Bajo | Bajo. Alto costo en los equipos debido a la corrosión del ácido. |
| Impacto Ambiental | Bajo, el tratamiento de agua residual no es necesario | Alto, el tratamiento de agua residual es necesario. | Alto, el tratamiento de agua residual es necesario. |

(Gog, et al., 2012)

La enzima empleada (Lipozyme CALB L), es una lipasa que cataliza la transesterificación reacciones de triglicéridos. Esta se utiliza en aplicaciones en las industrias de aceites y grasas a mejorar el bienestar físico y/o las propiedades nutricionales de los productos de triglicéridos. (www.novozymes.com).

2.2.4.6 Concentración de biocatalizador. Cuando se usan enzimas existe un rango de concentración en el cual se deben agregar, y depende de la lipasa y las condiciones del proceso. Nouredini agregó 300, 550 y 3000 mg de lipasa inmovilizada de *P. cepacia* en la metanólisis de aceite de soya en 1h y encontró rendimientos de 61, 65 y 47% mol, respectivamente. Para el mismo aceite con lipasa libre de *C. viscosum* agregando 10, 50, 75 y 100 mg de la lipasa se obtuvo rendimientos de 50, 61, 69 y 48%, en 8 h. Esto indica que una cantidad elevada de biocatalizador limita el rendimiento, lo cual se debe a que la viscosidad del medio aumenta, dificultando el contacto entre los componentes. (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.7 Tiempo de reacción. En la catálisis enzimática este parámetro puede ser mayor que el utilizado en la catálisis química, se ha reportado que cuando se transesterifica el aceite de jatrofa con *R. oryzae* durante 60 h se obtiene un rendimiento del 80%, utilizando una relación molar metanol:aceite del 3:1 y un contenido de humedad del 5%. Sin embargo, al transesterificar aceite de soya con *Pseudomonas cepacia* utilizando una relación molar etanol:aceite de 9.5:1 y un porcentaje de agua del 3%, se obtiene un rendimiento del 63% al cabo de 1 h, y a las mismas condiciones pero a un tiempo de 5 h el rendimiento aumenta sólo hasta el 67% (Rojas, et al, 2010).

2.2.4.8 Intensidad del mezclado. En la catálisis enzimática no sólo es importante agitar al comienzo de la reacción, sino también, durante el transcurso de ella, ya que una vez alimentados los reactivos se forma un sistema de tres fases inmiscibles entre el aceite, el metanol y la enzima. Al final de la reacción no se requiere agitación, ya que se busca desestabilizar la emulsión formada y dar paso a la separación de las fases (biodiesel/glicerina/enzima). Es de notar que el efecto del mezclado en la cinética de la transesterificación es la base para el escalado y diseño del proceso. En este tipo de catálisis se aconseja una velocidad de agitación

entre 150–200 rpm para no afectar la estructura de la lipasa. Sin embargo, se han reportado velocidades de agitación de 500 y 700 rpm, sin efectos importante durante la reacción. Cuando la lipasa se encuentra inmovilizada en un soporte sólido, se requiere mayor velocidad de agitación para disminuir la saturación de los poros del soporte con la glicerina (Rojas, et al, 2010).

2.2.5 NORMAS DE CALIDAD PARA LA EVALUACIÓN DEL BIODIESEL

Los usuarios de Biodiesel, incluyendo los constructores de motores como de las demás partes intervinientes, necesitan del desarrollo de normas confiables que den seguridad para facilitar su comercialización.

En Europa, se venía evaluando la calidad del biodiesel por la Norma Alemana DIN-V 51606:1994; actualmente la Comunidad Europea maneja su propia norma de calidad, la Norma EN14214:2003. La normativa europea tiene la particularidad de incluir el número de yodo, ya que generalmente, en dicho continente se utiliza aceite de colza en la fabricación de biodiesel; siendo un máximo aceptable igual a 115 que excluiría al aceite de soja y sus ésteres, puesto que éstos exceden dicho límite (Guerra, 2005).

En Venezuela, no se cuentan con estándares propios, tal como en otros países, ya que el tema de los biocombustibles aún se encuentra en estudio, y son pocos los sectores que practican dichas técnicas, por tal motivo, se suelen utilizar la norma europea EN14214:2003 y la americana ASTM D 6751:2008, para la caracterización del biodiesel producido.

Tabla 2.2 Estándares americanos y europeos para la regulación de biodiesel

| Propiedad | Norma | Estados Unidos | | Unión Europea | |
|---|--------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | | unidad | ASTM 975 – 04c diesel | ASTM 6751-03a biodiesel | EN 590: 2004 diesel |
| Flash point | °C | | 38 (n.1D) 52 (n.2D) | 130 | 55 120 |
| Agua y sedimentos | % vol | | 0,05 | 0,05 | --- |
| Agua (max) | mg/kg | | --- | --- | 200 500 |
| Contaminación total (max.) | mg/kg | | --- | --- | 24 24 |
| Destilación (90% o 85%EU) | °C | | <288 (n.1) 282-338 | <360 | <350 --- |
| Viscosidad cinemática | mm ² /s | | 1,3 – 2,4 1,9 – 4,1 | 1,9-6,0 | 2,0 – 4,5 3,5- 5,0 |
| Densidad | kg/m ³ | | --- | --- | 820 - 845 860 – 900 |
| Contenido de ésteres (min) | %vol | | --- | --- | < 5 > 96,5 |
| Cenizas (% peso, max.) | | | 0,01 | --- | 0,01 --- |
| Cenizas sulfatadas (% peso, max.) | | | --- | 0,02 | --- |
| Azufre (% peso, max.) | | | 0,05 o 15ppm | 0,05 o 15ppm | 50 o 10 ppm |
| Corrosión al cobre | | | < n.3 | < n.3 | clase 1 clase 1 |
| Número de cetano (min.) | | | 40 | 47 | 51 51 |
| Índice de cetano (min.) | | | > 40 | --- | 46 --- |
| Aromaticidad (% vol max.) | | | 35 | --- | --- |
| PAH (% peso max.) | | | --- | --- | 11 --- |
| Uno de estos: Punto de enturbamiento CFPP / LTFT | °C, | | regional | reportar | local & estación |
| Residuo de carbón (% peso max.) | | | 0,15 (n.1) 0,35 (n.2) | 0,05 | 0,30 0,30 |
| Número de acidez | mg KOH/g | | --- | 0,80 | --- |
| Estabilidad a la oxidación | horas | | --- | --- | > 6 |
| Glicerina libre (% peso max.) | | | --- | 0,020 | --- |
| Glicerina total (% peso max.) | | | --- | 0,240 | --- |
| Contenido de fósforo (% peso max) | | | --- | 0,001 | --- |
| Número de yodo | | | --- | --- | < 120 |
| Metanol (% peso max) | | | --- | --- | 0,20 |
| Metil-linolenato (% peso max) | | | --- | --- | 12,0 |
| Éster poli-insaturados (% peso max) | | | --- | --- | 1,0 |
| Mono-glicéridos (% peso max) | | | --- | --- | 0,80 |
| Di-glicéridos (% peso max) | | | --- | --- | 0,20 |
| Triglicéridos (% peso max) | | | --- | --- | 0,20 |
| Na + K | mg/kg | | --- | --- | 5,0 |
| Ca + Mg | mg/kg | | --- | --- | 5,0 |
| Lubricidad | µm | | < 520 | --- | < 460 --- |

Norma EN14214:2003 y ASTM D 6751:2008.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y diseño de la investigación

El tipo de investigación que se llevó a cabo en el presente trabajo, según la tendencia es **cuantitativo**, y según el análisis y el alcance de los resultados es **analítico**. La estrategia o diseño de la investigación, que se empleó para llevar a cabo los objetivos propuestos fue de **tipo experimental**, ya que a través de un medio físico en el cual se llevó a cabo el proceso de catálisis enzimática, se manipularon variables a diferentes condiciones de operación, para finalmente obtener una combinación de características que garanticen el mayor rendimiento en la recuperación del desecho graso y por ende en el proceso de obtención de biodiesel. (Arias, 2006).

3.2 Población y muestra

Se tomó como población de estudio los establecimientos de comida rápida ubicados en el municipio Puerto Cabello, sector el Palito, Parroquia Juan José Flores, Edo. Carabobo, la misma se encuentra conformada por aproximadamente 140 comerciantes formales e informales temporales. De dicha población, se tomó una muestra puntual de aceite usado de cincuenta (50) establecimientos, para conformar a su vez una muestra compuesta que se empleó como materia prima para la elaboración del biodiesel.

3.3 Tipo de muestreo

El tipo de muestreo que se empleó fue aleatorio simple, ya que la muestra fue elegida por el investigador, todos los establecimientos de comida rápida

que conforman la población tenían la misma probabilidad de ser elegidos como muestra de estudio (Grande y Abascal, 2009).

3.4 Encuestas

En paralelo mientras se tomaba la muestra en los establecimientos seleccionados, se realizó una encuesta a esta población, con el fin de obtener la máxima información sobre la cantidad, la calidad y el modo de disposición final del aceite vegetal usado que utilizan diariamente (ver encuesta en el Apéndice E).

3.5 Procedimientos técnicos

3.5.1 Caracterización del aceite de fritura usado

En función de determinar las propiedades físico-químicas más importantes se siguieron las siguientes metodologías:

Densidad relativa a 20°C. Norma COVENIN 703:2001. Aceites y Grasas Vegetales. Determinación de la densidad relativa a 20°C.

Índice de acidez: Para la determinación de ácidos grasos libres presente en el aceite, se realizó una titulación con una solución de hidróxido de sodio, usando como indicador fenolftaleína, el resultado se expresó como acidez o índice de acidez. Norma COVENIN 325:2001. Aceites y Grasas Vegetales. Determinación de acidez.

Índice de saponificación: Se determinó mediante la adición de una solución alcohólica de KOH al aceite, y su posterior calentamiento a reflujo por espacio de 2 horas, luego se titula el exceso de KOH en caliente con HCl 0,5N usando fenolftaleína como indicador, de acuerdo a la Norma

Venezolana COVENIN 323:1998. Aceites y Grasas Vegetales. Determinación del índice de saponificación.

Estudio del perfil lipídico:

Formación de ésteres metílicos

- a. Se pesó 0,5 g de aceite.
- b. Se adicionó 10 gotas de una solución de KOH en metanol 0,5N y 2mL de Hexano grado HPLC.
- c. Se agitó en un vortex por 2min y se deja reposar por 3min, hasta observar la división de la fases.
- d. Se extrajo la fase de Hexano con una pipeta pasteur y se filtró con Sulfato de Sodio Anhidrido y por último se pasó la solución por un filtro microporoso, colocándose en un vial de 2mL.
- e. Posteriormente, se procedió al estudio cromatográfico (Norma ISO 5909:2000, modificada).

Estudio cromatográfico

El estudio cromatográfico, se llevó a cabo empleando un Cromatógrafo de Gases marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500.

Bajo las siguientes condiciones:

- Columna: capilar polar Supelco 2560 (100m; 0,25mm; d.i. 250µm espesor de película, biscyanopropyl polysiloxane).
- Gas acarreador: Hidrógeno a 30 psi
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Temperatura del detector (FID): 250°C
- Temperatura del inyector: 225°C

- Rampa de calentamiento de la columna: 100°C por 4 min, luego se incrementa hasta 240°C a 3°C/min, y se mantiene por 10 min (Método A.O.A.C modificado, 1990) (La Rosa, 2005) (Norma ISO 6800:1997).

3.5.2 Obtención del biodiesel a partir del aceite de fritura usado, vía catálisis enzimática

La enzima empleada para llevar a cabo los objetivos propuestos es de tipo Lipasa, cuyo nombre comercial es Lipozyme Calb L®, suministrada por la casa comercial Novozymes.

Se realizó un diseño experimental del tipo factorial, el cual se explica a continuación:

Diseño Experimental

Evaluando los diferentes estudios que se han llevado a cabo en la obtención de biodiesel por vía enzimática a partir de aceite vegetal usado (Gog, 2012; Meng, L. y Salihon J., 2011; Lafont, J., et al., 2011; Otero, et al. 2010), se establecieron como variables de estudio; la cantidad de enzima, la relación molar metanol/aceite y el tiempo de reacción (variables independientes).

Como puede verse en la Figura 3.1 la Casa Novozyme reporta una curva de actividad de la enzima, donde se recomienda un rango de temperatura, entre 40 y 60°C, para alcanzar una actividad máxima (www.novozymes.com). Tomando en cuenta estos datos y los resultados obtenidos por Maceiras et al, 2010, donde se obtuvo biodiesel a partir de aceite vegetal usado empleando la misma enzima, se escogió como temperatura de trabajo 50°C, la cual se

mantuvo constante durante todo el proceso al igual que la agitación del sistema (150rpm).

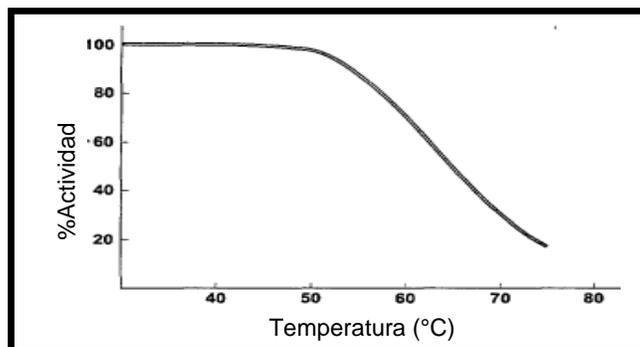


Figura 3.1 Influencia de la temperatura en la actividad de la Lipozyme CALB L (www.novozymes.com)

Tomando en cuenta los posibles factores que afectan la variable respuesta, se planteó entonces un diseño experimental de tipo factorial mixto (Gutiérrez y De la Vara, 2004), con el fin de estudiar el efecto de los mismos, sobre el rendimiento en el proceso de obtención de biodiesel, entendiéndose este como la relación entre el producto obtenido (biodiesel) y la cantidad de materia prima utilizada (aceite vegetal usado), o variable dependiente.

Los niveles de estudio para cada factor a estudiar, se escogieron tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

1.-Porcentaje en enzima: En muchos casos el aumento en la cantidad de lipasa mejora el rendimiento de reacción. Meceiras et al, 2010; emplearon una cantidad de 10% de Lipozyme Calb L para la obtención de biodiesel, teniendo rendimientos de reacción por encima del 95%, tomando en cuenta que este es un factor determinante puesto que aumentaría o disminuiría el costos del proceso (Rojas, et al, 2010), se decidió emplear también un porcentaje menor de enzima, eligiendo así trabajar con 1%.

2.-Relación molar: Maceiras et al, en el 2010, explican que teóricamente la relación volumétrica aceite:alcohol es 1:3, cuando se emplea las lipasas como catalizadores, un exceso de alcohol puede desactivar la enzima, es por ello que recomiendan emplear una relación 1:2, para minimizar la inactivación de la enzima, es por ello que se tomó en cuenta dicha proporción y se empleó una menor relación 1:1, con el fin de evaluar el comportamiento de la enzima con una menor cantidad de metanol. (Ver cálculo de aceite y metanol a emplear en el Apéndice E)

3.- Tiempo de reacción: Maceiras et al, 2010, estudiaron como varía la actividad de la enzima Lipozyme CalbL, en cuanto al tiempo de reacción, variando este desde último desde 0,5 h hasta 8 h de reacción, encontrando que se obtiene un mayor porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos a las 3 horas de reacción, luego de este tiempo el rendimiento es prácticamente constante. Tomando en cuenta estos resultados, se escogió como tiempo de reacción 3h y un valor menor el cual fue 2h.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el diseño factorial 2^3 , quedó de la siguiente manera:

Tabla 3.1 Diseño factorial 2^3 utilizado para el análisis del proceso de producción de biodiesel vía catálisis enzimática

| Factor de estudio | Nivel establecido | |
|-------------------------------|-------------------|----------|
| | Bajo (-1) | Alto (1) |
| Porcentaje de enzima (%m/m) | 1 | 10 |
| Relación molar aceite:metanol | 1:1 | 1:2 |
| Tiempo de reacción (h) | 2 | 3 |

A partir del diseño factorial, se obtiene entonces la matriz de experimentos a seguir para llevar a cabo los objetivos propuestos (ver Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Matriz de experimentos para la realización del diseño factorial 2^3 para la elaboración de biodiesel vía catálisis enzimática

| Reacción | Tiempo (h) | Porcentaje de Enzima (%) | Relación Aceite:Metanol |
|----------|------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 3 | 1 | 1:2 |
| 2 | 3 | 10 | 1:1 |
| 3 | 2 | 1 | 1:1 |
| 4 | 2 | 10 | 1:2 |
| 5 | 3 | 10 | 1:2 |
| 6 | 2 | 1 | 1:2 |
| 7 | 2 | 10 | 1:1 |
| 8 | 3 | 1 | 1:1 |

Metodología para la Obtención del Biodiesel

Ya definidos los factores y la variable respuesta se procedió a llevar a cabo la obtención del biodiesel vía catálisis enzimática siguiendo la matriz de experimentos (Tabla 3.2) y la siguiente metodología:

- a) Se filtró el aceite vegetal usado.
- b) Se tomaron 60mL de aceite vegetal usado y se agitó con la cantidad de enzima (Lipozyme Calb L) a emplear (ver Tabla 3.2), durante 5min.
- c) Se adicionó luego la cantidad de metanol correspondiente para obtener la relación volumétrica a estudiar (ver Tabla 3.2).
- d) Se procedió a realizar el montaje de reacción (ver Figura 3.2), controlando la temperatura (50°C) y la agitación (150rpm), durante el tiempo de reacción indicado en la Tabla 3.2.



Figura 3.2 Montaje de la reacción de transesterificación

- e) Trascurrido el tiempo de reacción se trasvasó el contenido a un embudo de separación de 125mL, donde se dejó separar las fases por 30min.
- f) La fase de biodiesel obtenida se filtro empleando un papel Whatman N°42, se secó con sulfato de sodio anhidrido y finalmente se filtró empleando un filtro microporoso.

Tomando en cuenta el rendimiento de la reacción, en función de la cantidad del éster metílico con mayor proporción (ácido linoléico), se procedió al análisis de los resultados empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI, donde se obtuvo:

- ✓ Tabla Anova; en la cual se observan los grados de libertad, la suma de cuadrados, medias de cuadrado, factor de Fischer (Fo) y nivel de significancia (p-valor), obteniendo así una significancia estadística para cada efecto por medio de una comparación de medias de cuadrados frente a un estimado del error experimental.

- ✓ Diagrama de Pareto, en el cual se representó cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud, esto permite identificar de manera gráfica los efectos de cada factor sobre la variable respuesta, con una diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%. La longitud de la barra es proporcional al efecto estandarizado. La línea vertical se utiliza para juzgar que efectos son estadísticamente significativos a un nivel de confianza establecido.
- ✓ Gráfico de efectos principales, donde se representó la magnitud de los efectos estudiados sobre la variable respuesta.

3.5.3 Determinación de las propiedades y características del biodiesel obtenido

Una vez obtenida la fase de biodiesel, se procedió a la caracterización del producto.

Determinación de la densidad a 20°C.

Norma COVENIN. Aceites y Grasas Vegetales. Determinación de la densidad relativa a 20°C. 703:2001.

Determinación de la viscosidad dinámica a 40°C

Utilizando el método de viscosidad de Ostwalds.

Determinación de espectros por Espectroscopía de Infrarrojo

Se utilizó un infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), marca Perkin Elmer, modelo Precisely Spectrum 100. Es importante, acotar que para la determinación de los espectros de las muestras líquidas de biodiesel, se tomaba una pequeña alícuota de cada una, y se realizaba la medición directa en el equipo.

Determinación y cuantificación de ésteres metílicos empleando el método de cromatografía de gases.

Se evaluaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) del biodiesel; mediante un estudio de cromatografía de gases (CG) para lograr establecer la composición de los ácidos grasos presentes.

El estudio cromatográfico, se llevó a cabo empleando un Cromatógrafo de Gases marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500.

Bajo las siguientes condiciones:

- Columna: capilar polar Supelco 2560 (100m; 0,25mm; d.i. 250 μ m espesor de película, biscyanopropyl polysiloxane).
- Gas acarreador: Hidrógeno a 30 psi
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Temperatura del detector (FID): 250 $^{\circ}$ C
- Temperatura del inyector: 225 $^{\circ}$ C
- Rampa de calentamiento de la columna: 100 $^{\circ}$ C por 4 min, luego se incrementa hasta 240 $^{\circ}$ C a 3 $^{\circ}$ C/min, y se mantiene por 10 min (Método A.O.A.C modificado, 1990) (La Rosa, 2005) (Norma ISO 6800:1997).

Bajo estas condiciones, se identificaron los ácidos grasos, comparando los tiempos de retención del patrón empleado con la muestra y se cuantificaron por integración de las áreas de los picos empleando el método de normalización de área.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se encuentran reflejados los resultados obtenidos luego de llevar a cabo los objetivos propuestos, así mismo se presenta el análisis y las discusiones correspondientes.

4.1 Encuestas

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la encuesta realizada a la población en estudio.

De acuerdo a la Figura 4.1 se puede observar que el 42% de la población encuestada laboran durante toda la semana, dicha población generalmente están conformados por comerciantes fijos que tienen un establecimiento comercial. Mientras que aquellas personas que representan el 40% trabajan sólo dos días a la semana, generalmente fines de semana (sábado y domingo) éstas personas se establecen en las aceras a vender sus productos, son catalogados como comerciantes informales del tipo temporal, estas personas no tienen una estructura física asociada para vender los productos que elaboran.



Figura 4.1 Cantidad de días laborados por los comerciantes del sector “El Palito” Parroquia Juan José Mora

Los resultados de la Figura 4.2 reflejan que el 100% de los encuestados elaboran empanadas como producto principal, un 25% de personas comercializan otros tipos de productos tales como: papas, arepas y pescados.

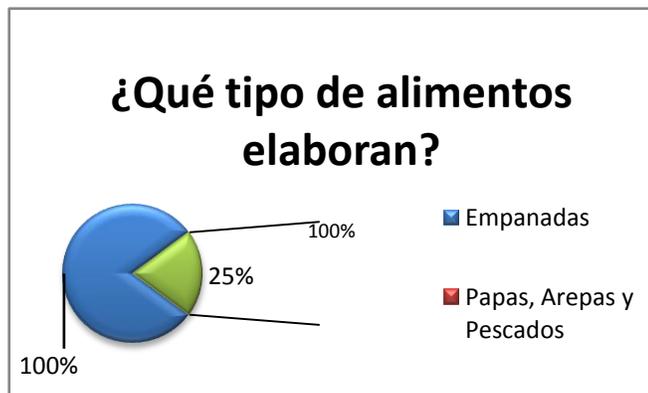


Figura 4.2 Alimentos elaborados por los comerciantes del sector “El Palito” parroquia Juan José Mora, Puerto Cabello Edo. Carabobo

Al analizar la Figura 4.3, se puede observar que las personas encuestadas en cada uno de los establecimientos visitados respondieron que emplean aceite para la elaboración de los alimentos fritos, sin embargo hay que destacar que no especificaron marca comercial alguna, puesto que esto dependen de la disponibilidad que haya en el mercado, no obstante se pudo notar que la mayoría emplea aceite de soya, está aseveración viene dada por la marca comercial que se observó en el lugar.

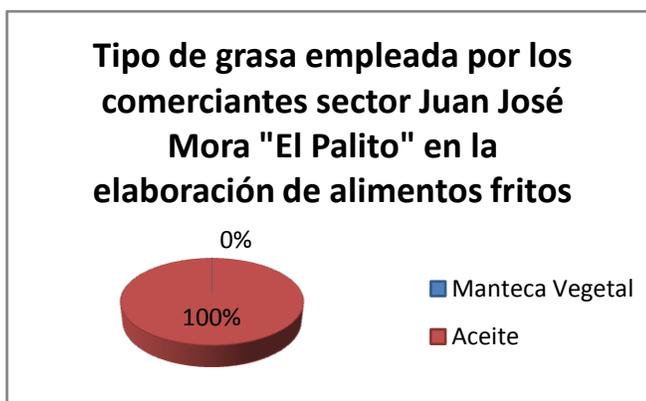


Figura 4.3 Tipo de grasa empleada por los comerciantes que laboran en “El Palito”

El 55% de los establecimientos encuestados emplean 2L de aceite para la elaboración de sus alimentos (ver Figura 4.4), mientras que el 50% cambian dos veces dicha grasa durante la jornada laboral (ver Figura 4.5), estos son resultados muy relevantes puesto que se puede inferir cuanto aceite se generaría diariamente por cada establecimiento. Si cada persona emplea 2L de aceite y añade dos veces al día 2L mas, se estaría utilizando en total 6L de aceite por comercio diariamente. Por ejemplo; si dicha persona trabaja durante toda la semana (de acuerdo a los resultados reflejados en la Figura 4.1) se estarían empleando 42L de aceite semanal por comercio. Teniendo en cuenta estos resultados se puede estimar el volumen de aceite que se genera en una semana de trabajo; si la población de estudio está compuesta por aproximadamente 59 establecimientos (lo cual representa el 42% del total de establecimiento de comerciantes que trabajan durante toda la semana), se gastarían entonces aproximadamente un total de 2478L de aceite, restando la cantidad de aceite absorbido por el alimento durante el proceso de fritura el cual de acuerdo a lo publicado por Marcano, et al 2010, es cerca de un 16%, se estaría desechando alrededor de 2082L.



Figura 4.4 Cantidad de grasa empleada por los comerciantes del sector Juan José Mora “El Palito”

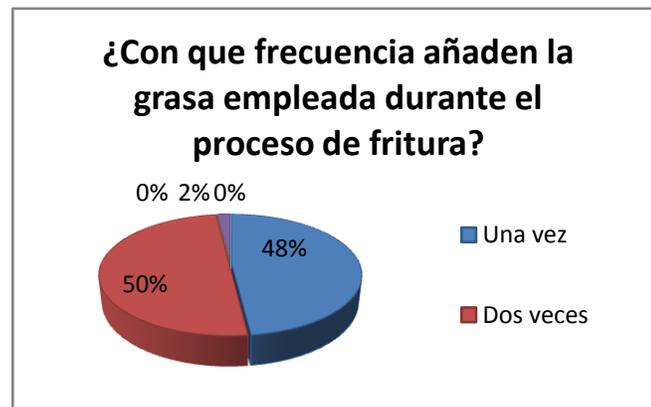


Figura 4.5 Cantidad de veces en la cual los comerciantes del “El Palito” añaden grasa para seguir realizando el proceso de fritura

De acuerdo a los resultados reflejados en la Figura 4.6, el 74% de los comerciantes encuestados respondieron que luego del proceso de fritura, dejan reposar la grasa y la guardan en envases de plástico, agregándola posteriormente a la basura común para su disposición final. El 18% arroja el aceite en el suelo (zonas verdes) adyacente a la zona, mientras que el 6% la arroja por la cañería. Guardar el aceite en envases plásticos y luego

descartarlo en la basura, es la mejor opción de todas las respuestas de la encuesta realizada desde el punto de vista ambiental, sin embargo hay que tomar en cuenta que todos estos envases irían directo al relleno sanitario de Puerto Cabello sin ningún tipo de disposición especial.

Los aceites vegetales usados descartados en el agua y/o suelo, son potencialmente peligrosos para el ambiente debido a su habilidad de esparcirse en grandes áreas de suelo y agua, formando una película en el agua que no permite la restauración del oxígeno disuelto, deteriorando el proceso fotosintético y bloqueando la luz del sol, lo que produce rápidamente una significativa degradación de la calidad del ambiente terrestre y acuático.

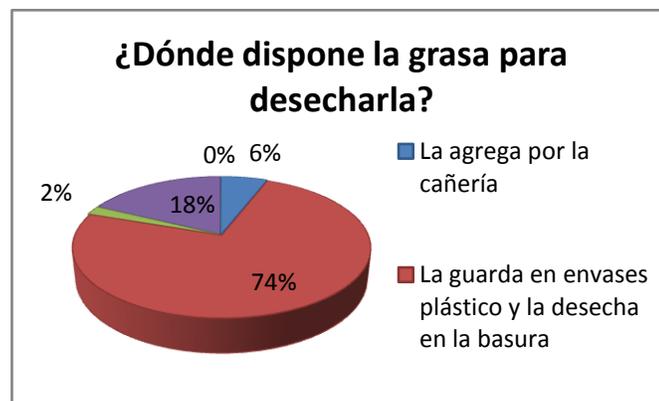


Figura 4.6 Modo de disposición final de la grasa empleada por los comerciantes del sector Juan José Mora de “El Palito”

El 65% de la población encuestada sabe que el aceite si se arroja de manera indiscriminada al medioambiente puede ocasionar daños ambientales importantes, sin embargo hay que tomar en cuenta que la mayoría no conoce cuáles podrían ser dichos daños (ver Figura 4.7).

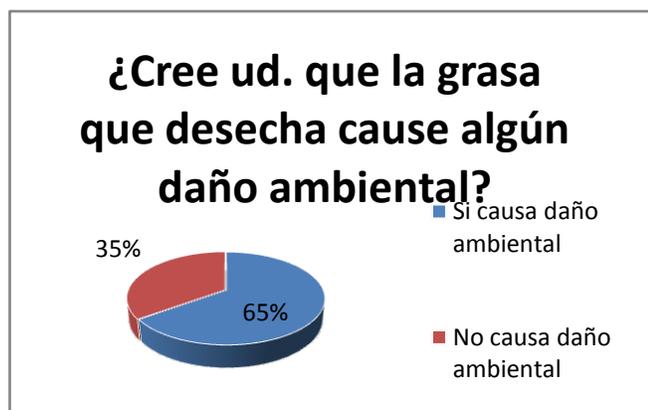


Figura 4.7 Conocimiento del daño ambiental por parte de la comunidad

Analizando los resultados arrojados en la aplicación de la encuesta se tiene que la población luego del proceso de producción diario, generaría una cantidad importante de aceite vegetal (2000L aproximadamente), la mayoría de estas personas están conscientes del daño ambiental que ocasionan los aceites vegetales usados, es por ello que recurren a la solución más viable o menos contaminante (almacenar el aceite en un contenedor plástico y arrojarlo a la basura), matriz grasa que va como desecho al vertedero más próximo sin ninguna posibilidad de gestión ambiental.

4.2 Caracterización de la matriz grasa

Los resultados de la caracterización se encuentran reflejados en las Tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1 Propiedades físico-químicas del aceite vegetal usado

| Propiedades | Valor obtenido | Valores de referencia ^(*) | | | |
|--|----------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Soya | Palma | Maíz | Girasol |
| Densidad ($\pm 0,0001$)g/mL | 0,9415 | 0,919-0,925 | 0,897-0,902 | 0,917-0,925 | 0,917-0,925 |
| Índice de Acidez ($\pm 0,02$)mgNaOH/gmuestra | 0,87 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Índice de Saponificación ($\pm 0,1$)mgKOH/gmuestra | 201,0 | 189-195 | 194-202 | 186-195 | 188-195 |

(*)Normas Covenin: 744:1999, 2953:2000, 743:2000 y 1272:1999.

El índice de acidez (Tabla 4.1), permite determinar la presencia de ácidos grasos libres en la muestra. De acuerdo a lo requerido por las Normas Covenin utilizadas como referencia, se puede observar que todas convergen en el hecho de que el índice de acidez debe ser menor a 0,1% para un aceite comestible. Como puede observarse la matriz grasa obtuvo un índice de acidez superior a lo requerido por las normas antes mencionadas, por lo que no puede ser utilizado para consumo humano. El índice de acidez indica la tendencia del aceite a oxidarse, debido a que en el proceso de autooxidación los más susceptible a la degradación son los ácidos grasos, por lo que al existir una mayor cantidad de ácidos grasos libres, el proceso de rancidez oxidativa se acelera (Marcano, et al, 2010).

Es importante mencionar que en el caso de la catálisis enzimática la presencia de ácidos grasos libres no afecta el rendimiento de la reacción, ya que las enzimas son capaces de llevar a cabo la reacción de esterificación directa a partir de ácidos grasos libres. Esto es una ventaja frente al proceso clásico en el cual se emplean catalizadores básicos donde la presencia de ácidos libres en las grasas o aceites, así como un alto nivel de oxidación, afectan de manera significativa los rendimientos de la reacción ya que

pueden causar reacciones paralelas de saponificación cuando un catalizador alcalino es utilizado en la reacción de transesterificación, la producción de jabón consume el catalizador, disminuye el rendimiento de ésteres metílicos de ácidos grasos y produce una separación menos efectiva de dichos ésteres, producido de la fase glicerol (Rivera, et al., 2009).

En otro orden de ideas, al observar los máximos permisibles para el índice de saponificación (ver Tabla 4.1), para los aceites de girasol, soya, maíz y oleína de palma respectivamente, se puede ver que el resultado obtenido se encuentra casi en el límite superior de lo requerido, lo cual ratifica el alto nivel de deterioro de la matriz grasa en estudio.

El perfil de ácidos grasos que se presentó la muestra se puede ver reflejado en la Tabla 4.2 y en la Figura A-1 (Ver Apéndice A), donde puede observarse que el residuo graso empleado está compuesto en su mayoría por Ácido Palmítico (C16:0), Ácido Linoléico (18:2), y Ácido Oléico (C18:1).

Tabla 4.2 Perfil lipídico del aceite vegetal usado

| Ester metílico | Porcentaje ($\pm 0,01$) |
|--------------------------|---|
| Acido Octanóico (C8:0) | 0,25 |
| Acido Palmítico (C16:0) | 14,49 |
| Acido Linoléico (C18:2) | 49,97 |
| Acido Oléico (C18:1) | 29,26 |
| Acido Esteárico (C18:0) | 5,11 |
| Acido Linolénico (C18:3) | 0,27 |
| Acido Araquídico (C20:0) | 0,49 |
| Acido Behénico (C22:0) | 0,16 |

4.3 Obtención de biodiesel mediante catálisis enzimática empleando una enzima lipasa (Lipozyme CALB L)

Para la evaluación de la enzima Lipozyme CALB L en la obtención del biodiesel se estudiaron tres factores fundamentales: la cantidad de enzima, la relación volumétrica metanol/aceite y el tiempo de reacción, luego de llevarse a cabo la reacción se midió la cantidad de ésteres metílicos de ácidos grasos presentes en la fase metanólica (biodiesel), con el fin de estudiar la influencia de cada factor sobre el rendimiento de la reacción.

La Figura 4.8 representa el cromatograma de una muestra de biodiesel obtenida luego del proceso de transesterificación del aceite vegetal usado, específicamente en la reacción 7 (ver Tabla 3.2) donde se puede observar que los esteres etílicos obtenidos de mayor proporción son: ácido palmítico (C16:0), ácido linoléico (C18:2) y ácido oléico (C18:1)

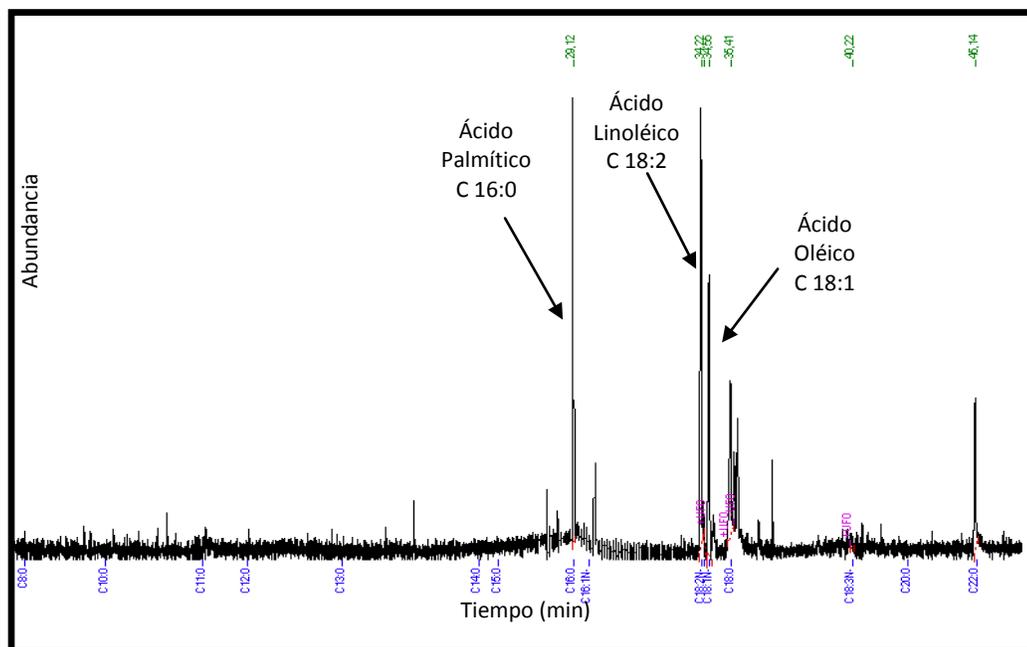


Figura 4.8 Cromatograma de una muestra de biodiesel obtenido luego de la transesterificación del aceite vegetal usado con Lipozyme CALB L

El rendimiento de la reacción fue medido por la cantidad de ácido linoléico (C18:2) obtenido en cada una de las reacciones, por ser este el ácido graso de mayor proporción, los resultados se pueden ver reflejados en la Tabla 4.3, dichos porcentajes se asemejan a los obtenidos por Marchetti y Errazu en el 2008, en el cual alcanzó rendimientos de hasta 95% en las reacciones de esterificación del ácido oléico con Lipozyme Calb L.

Tabla 4.3 Cantidad de ácido linoléico y porcentaje de rendimiento obtenido en las reacciones de transesterificación

| Reacción | Tiempo (h) | Porcentaje de Enzima (%) | Relación Aceite:Metanol | Porcentaje de Acido Linoléico ($\pm 0,01$)% | Rendimiento de la Reacción (Rend $\pm 0,01$)% |
|----------|------------|--------------------------|-------------------------|---|--|
| 1 | 3 | 1 | 1:2 | 35,21 | 70,47 |
| 2 | 3 | 10 | 1:1 | 41,97 | 83,99 |
| 3 | 2 | 1 | 1:1 | 37,47 | 74,99 |
| 4 | 2 | 10 | 1:2 | 48,41 | 96,88 |
| 5 | 3 | 10 | 1:2 | 43,32 | 86,69 |
| 6 | 2 | 1 | 1:2 | 42,22 | 84,49 |
| 7 | 2 | 10 | 1:1 | 47,41 | 94,89 |
| 8 | 3 | 1 | 1:1 | 31,50 | 63,04 |

Maceiras y colaboradores en el 2010 obtuvieron un rendimiento de reacción mayor al 95%, empleando 10% de enzima Lipozyme Calb L, un tiempo de 2h y una relación molar aceite:metanol 1:2, comparando con el rendimiento obtenido en la presente investigación tomando en cuenta las mismas variables se puede observar que se obtuvo un porcentaje aproximado a lo reportado.

El análisis estadístico de los resultados se encuentran reflejados en la tabla ANOVA (Tabla 4.4) y en las Figuras 4.10 y 4.11.

Tabla 4.4 Análisis ANOVA obtenido para el diseño de experimento de obtención de Biodiesel a partir de aceite vegetal usado por vía enzimática

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Tiempo | 276,83 | 1 | 276,83 | 286,56 | 0,0376 |
| B:Cant Enzima | 603,09 | 1 | 603,09 | 624,28 | 0,0255 |
| C:Cant Metanol | 58,43 | 1 | 58,43 | 60,48 | 0,0814 |
| AB | 2,98 | 1 | 2,98 | 3,08 | 0,3297 |
| AC | 0,23 | 1 | 0,23 | 0,24 | 0,7104 |
| BC | 18,73 | 1 | 18,73 | 19,39 | 0,1422 |
| Error total | 0,97 | 1 | 0,97 | | |
| Total (corr.) | 961,25 | 7 | | | |

De acuerdo a los valores obtenidos en el p-Valor se establece entonces que la cantidad de enzima y el tiempo de reacción causan un efecto estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95%.

El diagrama de pareto (Figura 4.9) ratifica los resultados obtenidos en la Tabla Anova, en el se puede observar que el tiempo y la cantidad de enzima tienen una influencia significativa sobre la variable respuesta, puesto que superan la barrera de la línea vertical.

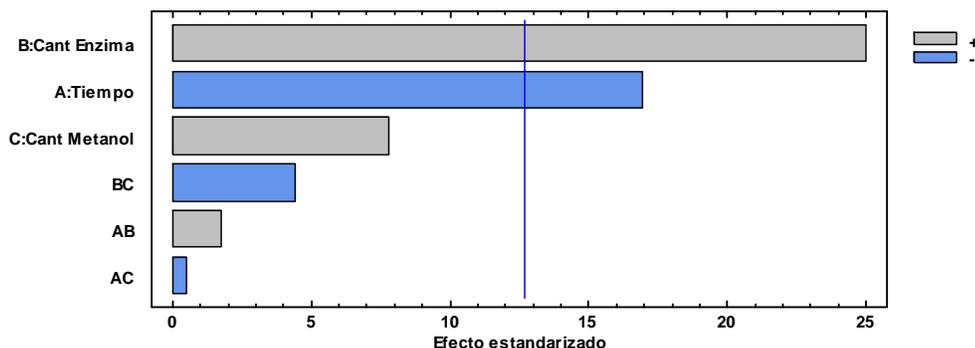


Figura 4.9 Diagrama de pareto de los efectos estandarizados y sus interacciones sobre el rendimiento de la reacción de obtención de biodiesel a partir de aceite vegetal usado.

En la Figura 4.10 se encuentran graficados los efectos principales, observándose que la cantidad de enzima ejerce un efecto positivo sobre la variable respuesta, caso contrario se obtiene con el tiempo, el cual ejerce un efecto negativo, por lo que cuando éste se encuentra en su nivel más alto el rendimiento de la reacción disminuye.

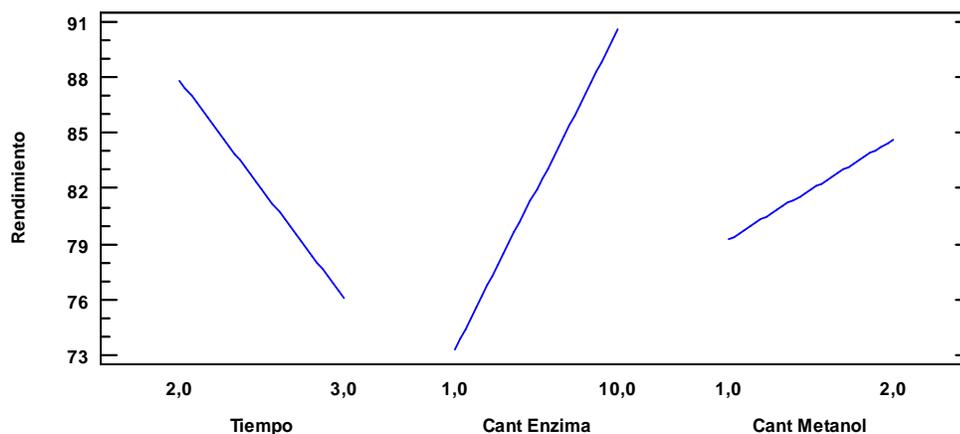
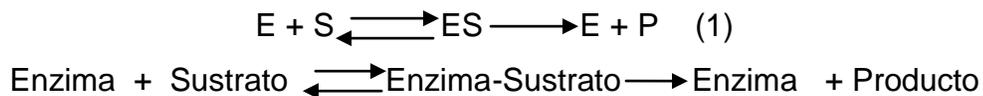


Figura 4.10 Efectos principales que afectan el rendimiento de la reacción de obtención de Biodiesel a partir de aceite vegetal usado.

De acuerdo a los resultados obtenidos a menor tiempo de reacción y mayor cantidad de enzima se obtiene un mayor rendimiento en la reacción.

La cantidad de enzima es un factor que limita la velocidad de reacción, en presencia de una menor cantidad de enzima, la población de moléculas de enzimas disponible se satura, lo que significa que todas las moléculas de enzimas están ocupadas por una molécula de sustrato casi todo el tiempo, por lo que a partir de la velocidades de reacción a concentraciones baja de enzima el equilibrio enzima-sustrato se obtiene más lentamente, que a concentraciones elevadas. (Hill R. y Gordon A., 2006).



Hay que tomar en cuenta que cuando se usan enzimas existe un rango de concentración en el cual se deben agregar, y depende de la lipasa y las condiciones del proceso. Nouredini hizo reaccionar aceite con lipasa libre de *C. viscosum* agregando 10, 50, 75 y 100 mg de la lipasa obtuvo rendimientos de 50, 61, 69 y 48%, en 8 h (Shweta y Gupta, 2004), respectivamente. El autor indica que una cantidad elevada de biocatalizador limita el rendimiento, lo cual se debe a que la viscosidad del medio aumenta, dificultando el contacto entre los componentes (Shweta y Gupta, 2004). Sin embargo, se puede establecer que un aumento en la cantidad de lipasa mejora el rendimiento de la reacción (Rojas, et al, 2010).

Con respecto al tiempo de reacción se puede ver que mientras sea menor el tiempo mayor será el rendimiento de la misma esto se debe a una posible desactivación de la enzima, ya que se encuentra en contacto con el alcohol por una mayor cantidad de tiempo, los alcoholes de cadena corta tales como el metanol pueden producir la pérdida de actividad de las enzimas, debido a la baja solubilidad de los alcoholes en el aceite. En un estudio de metanólisis continua, usando Novozym 435 como catalizador, Shimada *et al.* (2002) sugirieron que el metanol sin reaccionar migra desde la mezcla de la reacción a la capa de glicerol, cubriendo las enzimas y generando su inhibición.

Por último, hay que tomar en cuenta que a pesar de que la relación molar aceite:metanol no fue un factor significativo de acuerdo a los resultados arrojados por el diseño de experimento, sin embargo las relaciones

evaluadas fueron adecuadas puesto que se obtuvieron rendimientos por encima del 76%.

4.4 Comparación de las características y propiedades del biodiesel obtenido con los estándares establecidos internacionalmente.

Los resultados obtenidos en las propiedades físico-químicas evaluadas permiten afirmar si el biodiesel elaborado cumple con los estándares de calidad establecidos en la Norma EN 14214:2003.

En primer lugar se evaluó la viscosidad del biodiesel obtenido en cada una de las reacciones que se llevaron a cabo, las cuales se puede observar en la Figura 4.11.

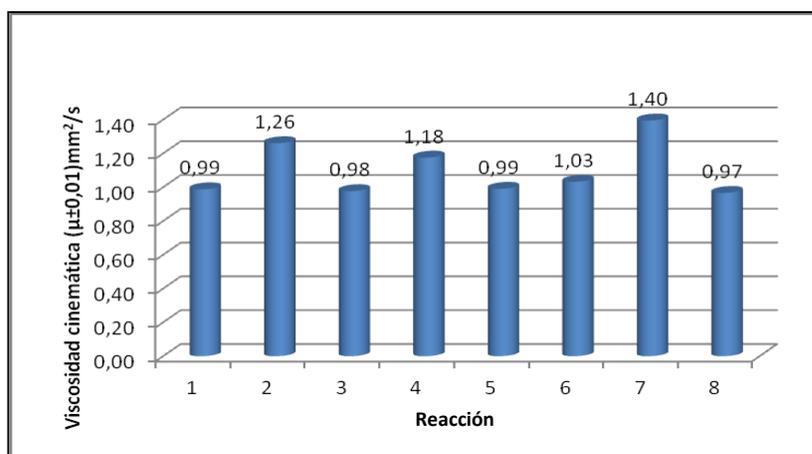


Figura 4.11 Viscosidad cinemática del biodiesel obtenido

Como puede observarse las reacciones con mayor viscosidad corresponden a aquellas a donde se empleó una mayor cantidad de enzima (ver Tabla 3.2), y por ende donde se obtuvo un mayor rendimiento de reacción (Reacciones: 2, 4, y 7).

Cabe destacar que la viscosidad de las muestras de biodiesel obtenidas no alcanzan el rango establecido por la Norma europea EN14214:2003, la cual establece que el rango de la viscosidad cinemática debe estar entre 3.5 y 5.0 mm^2/s , esto puede deberse a restos de metanol presente en la muestra, lo cual causa la dilución de la misma. Sin embargo, dichos resultados no presentan un problema, puesto que la combustión de los motores se ven comprometidas solo en viscosidades altas, la cual puede deberse a la presencia de glicerina en el biodiesel. Esto tiene un impacto en los inyectores de combustible de los automóviles, ya que se aumenta la resistencia al flujo del combustible. También puede provocar problemas de almacenamiento debido a que el exceso de glicerina puede precipitar en el fondo de los depósitos del combustible (Varty y Lishawa, 2008).

En segundo lugar se evaluaron los resultados obtenidos para la densidad de cada muestra de biodiesel, lo cuales pueden verse en la Figura 4.12.

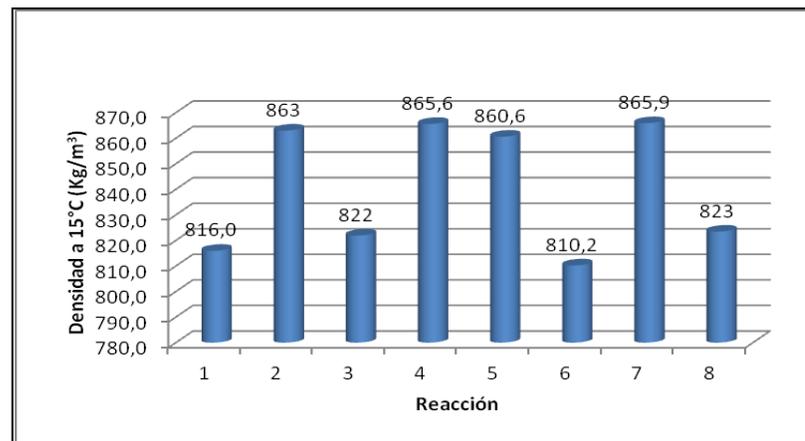


Figura 4.12 Densidad obtenida para el biodiesel

Como puede observarse las muestras de biodiesel provenientes de las reacciones 2, 4, 5 y 7, son las que alcanzan los valores requeridos por la Norma EN14214:2003, cuyo rango debe estar entre 860 y 900 Kg/m^3 . En

estas reacciones (ver Tabla 4.3), es donde se ha empleado una mayor cantidad de enzima y se han obtenido un mayor porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos.

La densidad del biodiesel se incrementará por los restos de glicerina existentes y disminuirá por los de metanol (Varty y Lishawa, 2008).

Por último, la Figura 4.13 representa el espectrograma infrarrojo de los ésteres metílicos del biodiesel obtenido, en la figura se observan las bandas características generadas por el alargamiento C=O y C-O, las vibraciones correspondientes al alargamiento C=O se encuentran aproximadamente alrededor de $(1744,86 \pm 0,01) \text{cm}^{-1}$, esta banda indica la presencia de ésteres metílicos alifáticos. La tensión del enlace C-H aparece como absorción ancha, relativamente intensa alrededor de $(2872,62 \pm 0,01) \text{cm}^{-1}$.

Las bandas $(1448,58 \pm 0,01) \text{cm}^{-1}$ y $(1349,82 \pm 0,01) \text{cm}^{-1}$, representan vibraciones de flexión C-H correspondientes a la unión de los grupos CH_3 y CH_2 .

Por otra parte las frecuencias localizadas a los $(1253,80 \pm 0,01) \text{cm}^{-1}$ y los $(1168,76 \pm 0,01) \text{cm}^{-1}$ verifican la existencia de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga.

Las bandas de absorción observadas en el espectrograma de las muestras de biodiesel obtenidas, se correlacionan con las reportadas por Guerrero y Seijas en el 2008, donde se obtuvo biodiesel a partir de aceites vegetales usados empleando catálisis homogénea y heterogénea.

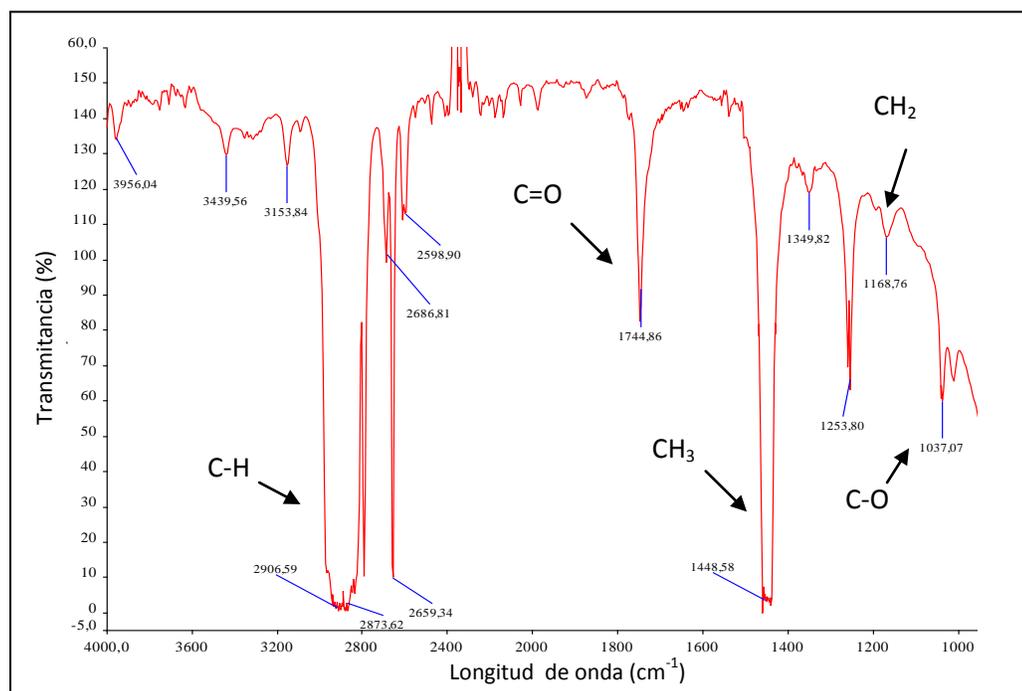


Figura 4.13 Espectrograma infrarrojo con transformada de Fourier de los ésteres metílicos obtenidos a partir de aceite vegetal usado empleado como catalizador Lipozyme CALB L.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el rendimiento de las reacciones de transesterificación llevadas a cabo y evaluando las propiedades físico-química del producto, se puede establecer que es factible técnicamente obtener biodiesel a partir de aceite vegetal usado, esto constituiría una disposición correcta de los aceites vegetales residuales, resolviendo no solo un grave problema de contaminación de los sistemas de drenaje municipal, sino que además representa una oportunidad para utilizar la energía disponible en los compuestos orgánicos desechados, compuestos ricos en carbono e hidrógeno transformados en biodiesel mediante una reacción de transesterificación.

4.5 Estimación del costo del biodiesel obtenido en el laboratorio mediante catálisis enzimática.

Desde el punto de vista económico se tiene que para llevar a cabo el proceso de elaboración de biodiesel a partir de aceite de fritura usado se requieren evaluar el costo de la tecnología empleada, para ello se deben tener en cuenta los gastos asociados al proceso de transesterificación del aceite, el cual se resume en la Tabla 4.5.

El costo de producción de biodiesel a escala de laboratorio se realizó tomando en cuenta que los reactivos utilizados fueron de grado analítico, para el cálculo se tomaron en cuenta los rendimientos promedio bajo las condiciones óptimas: mayor cantidad de enzima y menor tiempo de reacción.

Tabla 4.5 Costos de la materia prima para la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal usado empleando Lipozyme Calb L como catalizador

| Insumo | Cantidad de reactivo empleado para producir 1L de Biodiesel (mL) | Costo asociado a la producción de 1L de biodiesel (BsF) |
|------------------------------------|--|---|
| Metanol grado HPLC ($\pm 0,1$ mL) | 115 | 11,40 |
| Lipozyme Calb L ($\pm 0,1$ mL) | 10 | 5,61 |
| Electricidad (kW-h) | 10 | 0,45 |
| Agua | - | 0,45 |
| Total | - | 17,60 |

Los precios se obtuvieron a través de la página web de Sigma Aldrich

www.sigmaaldrich.com

De acuerdo a los resultados reflejados en la Tabla 4.5 se requieren 17,60BsF para la obtención de 1L de Biodiesel a partir del aceite vegetal usado.

Tomando en cuenta el cambio oficial de 6,3BsF=1\$, se tiene entonces un precio de 2,79\$ por litro de biodiesel.

En Venezuela no se comercializa este producto, por lo que no se tiene una cantidad con la cual comparar, sin embargo por ejemplo; en Colombia se tiene que 1L de biodiesel tiene un costo de 1,07\$ (www.fedebiocombustibles.com), por lo que el precio calculado a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se encuentra muy por encima de esta cantidad, esto debido a que se empleó metanol grado HPLC para llevar a cabo los análisis.

Se conoce que la elaboración de biodiesel empleando enzimas como catalizador es un proceso realmente costoso, no obstante el biodiesel obtenido trae beneficios ambientales implícitos, debido a que está formado por cadenas hidrocarbonadas que forman ésteres con dos átomos de oxígeno, lo que lo hace biológicamente activo haciéndolos fácilmente biodegradables en ambiente acuático. Zhang et al, 1998, mostró que el biodiesel derivado del aceite de colza y aquel derivado del aceite de soja poseen una biodegradabilidad del 88,49% en 28 días. La máxima biodegradabilidad del petrodiesel después de 28 días es del orden del 26%.

Por último, hay que tomar en cuenta que el objetivo de contar con combustibles provenientes de recursos renovables, teniendo en cuenta la creciente demanda mundial referida a la protección del medio ambiente, haciendo énfasis en la reducción de la emisión a la atmósfera de gases contaminantes, son argumentos valederos y de indiscutible solidez para planificar y desarrollar acciones tendientes a contemplar la producción del biodiesel a partir de aceite vegetal usado.

CONCLUSIONES

- ✓ El índice de acidez y de saponificación obtenidos en el aceite de fritura usado, son indicativos de que el aceite fue sometido a altas temperaturas, reutilizado varias veces y que no es apto para el consumo humano.
- ✓ El perfil lipídico de la matriz grasa está constituido principalmente por los ácidos grasos: Palmítico C16:0, Linoléico C18:2, Oléico C18:1, Esteárico C18:0, los cuales se encuentran en la siguiente proporción; (14,49±0,01%), (49,97±0,01%), (29,24±0,01%), (5,11±0,01%), respectivamente.
- ✓ A mayor cantidad de enzima y empleando un menor de tiempo de reacción, se obtiene un mayor rendimiento de reacción.
- ✓ La cantidad de enzima y el tiempo de reacción causan un efecto estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95%, sobre el rendimiento de reacción.
- ✓ La cantidad de enzima es el efecto principal en la obtención de biodiesel vía catálisis enzimática, empleando aceite vegetal usado como materia prima.
- ✓ Los cortos tiempos de reacción de este proceso genera una alternativa factible de ser implementada a escala industrial, generando un proceso con catalizador enzimático que podría llegar a ser económicamente competitivo con un proceso químico convencional.
- ✓ Las características físicas evaluadas en el biodiesel obtenido cumple en su mayoría con lo exigido en las normas internacionales.
- ✓ El análisis de espectroscopía de infrarrojo evidenció los grupos funcionales característicos del biodiesel.
- ✓ El reciclaje de aceites vegetales usados en la obtención de biodiesel es una alternativa viable desde el punto de vista técnico, ecológico y social en nuestro país, siendo su producción viable a escala comercial únicamente

cuando se reconozca que una verdadera calidad de vida, es aquella que respeta y está de la mejor forma posible en armonía con la naturaleza.

RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos correspondientes a la recuperación y reutilización de la enzima.
- Realizar el estudio de obtención de biodiesel vía catálisis enzimática empleando metanol grado técnico.
- Evaluar el biodiesel obtenido en un motor convencional.
- Impulsar el desarrollo de un reactor para la producción de biodiesel a escala semiindustrial en las condiciones que se establecieron dentro de este trabajo de investigación.
- Evaluar las características de la glicerina, subproducto del proceso de transesterificación, la cual tras su purificación puede ser utilizada en múltiples procesos, en la industria farmacéutica en la elaboración de medicamentos en forma de jarabes o como excipiente y en cosmética en la elaboración de jabones de tocador.
- Motivar a la población a la recolección de aceite vegetal usado, de tal manera que contribuyan a minimizar el impacto ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Ed. American Association of Analytical Chemist, Washington, DC.
- ✓ Al-Zuhair S. 2005. Production of biodiesel by lipasecatalyzed transesterification of vegetable oils: Akinetics study. Biotechnol Progress 21, 1442-1448.
- ✓ Arias F. 2006. El Proyecto de investigación. Introducción a la Metodología Científica. Editorial Episteme. Quinta edición. Caracas Venezuela.
- ✓ Benjumean, P., Agudelo, J. y Rios, A. 2009. Biodiesel: producción, calidad y caracterización. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia, Página 17.
- ✓ Boletín Oficial del Estado (BOE). 1989. Norma de Calidad para los aceites y grasas calentados. Número 26, páginas 2665-2667.
- ✓ Boletín Oficial del Estado (BOE). 2002. ORDEN MAM/304/2002. Operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Número 43.
- ✓ Cao, P.G., Tremblay, A.Y., Dube, M.A. 2009. Kinetics of canola oil transesterification in a membrane reactor. Ind. Eng. Chem. Res. 48(5), 2533–2541. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Nacional sede Medellín. Facultad de Minas.
- ✓ Cerveró JM, Coca J, Luque S. 2008. Production of biodiesel from vegetable oils. Grasas y Aceites 59, 76-83.
- ✓ Decreto 883. 1995. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos.
- ✓ Días E., Kreling, Botero R, Murillo J. 2007. Evaluación de la productividad y del efluente de biodigestores suplementados con

grasas residuales. *Tierra Tropical* (2007) 3 (2): 149-160 ISSN: 1659-2751.

- ✓ Díaz, J.; Parejo, C.; Pozuelo, I. 2003. El sector transporte. In Parte III. Balance de los Recursos Naturales desde la Perspectiva del Sistema Económico, Recursos Naturales de Andalucía. Educación Ambiental. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente (en línea). Disponible en http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/educacion_ambiental/EducamII/publicaciones/recursos_naturales_3_3.pdf
- ✓ Dizge N, Keskinler B. 2008. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass Bioenergy* 32, 1274-1278.
- ✓ Dobarganes MC, Márquez Ruiz G. 2006. Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides. In *Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications*. 2nd edition. Ed. By M.D. Erickson. American Oil Chemists' Society, (Champaign, Illinois), pp 87-110.
- ✓ Du W. 2005. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalized transesterificación of soybean oil for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B. Enzymatic* 37, 68-71.
- ✓ Elías X, 2009. Reciclaje de residuos industriales, residuos sólidos urbanos y fangos de depuradora. 2da Edición. Editorial Díaz de Santos, S. A. Madrid, pp. 218-220.
- ✓ Gog, A., Roman, M., Tos, M., Paizs, C. y Dan Irimie F. 2012. Producción de biodiesel empleando transesterificación enzimática- Estado actual y perspectivas. *Renewable Energy* 39 10-16
- ✓ Grande I. y Abascal E. 2009. Fundamentos y técnicas de Investigación Comercial. Editorial ESIC. Decima Edición. Madrid España.

-
- ✓ Guerra, M .2005. Obtención de biodiesel a partir de oleína de palma utilizada en fritura de alimentos. Trabajo especial de grado (No publicado). Universidad de Carabobo. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Venezuela.
 - ✓ Guerrero M y Seijas N. 2008. Evaluación del proceso de obtención de biodiesel vía catálisis homogénea y heterogénea a partir de un aceite de desecho como alternativa tecnológica para la protección ambiental. Trabajo Especial de Grado, no publicado. Universidad de Carabobo.
 - ✓ Gutiérrez, H., y De la Vara, R. 2004. Análisis y diseño de experimentos, México. Editorial McGraw- Hill, primera edición.
 - ✓ Hilbert, J. 2007. Selección de indicadores que permitan determinar cultivos óptimos para la producción de biodiésel en las eco-regiones Chaco-Pampeana de la República Argentina. Instituto de Ingeniería Rural INTA. Argentina. 111 p.
 - ✓ Hill R., Gordon A. 2006. Fisiología animal. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. pp 48-49.
 - ✓ Komers, K., Skopal, F., Stloukal, R., Machek, J. 2002. Kinetics and mechanism of the KOH—catalyzed methanolysis of rapeseed oil for biodiesel production. Eur. J.Lipid Sci.Technol. 104(11), 728–737
 - ✓ La Rosa, Y. 2005. Estudio de los monómeros cíclicos de ácidos grasos en triglicéridos presentes en el aceite de palma a partir de su calentamiento controlado. Trabajo de ascenso no publicado. Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo. Bárbula.
 - ✓ Lafont, J., Páez, M. y Torres, Y. 2011. Análisis Químico de Mezclas Biodiesel de Aceite de Cocina Usado y Diesel por Espectroscopia Infrarroja. Información Tecnológica Vol. 22(4), 35-42 (2011).

-
- ✓ Maceiras, R., Vega, M., A. Cancela, M.C. Márquez. 2010. Enzymatic alcoholysis for biodiesel production from waste cooking oil. *Chemical Engineering Trans* 19, pp 103-107.
 - ✓ Marcano, J., La Rosa, Y., Salinas N. 2010. Influencia del proceso de fritura en profundidad sobre el perfil lipídico de la grasa contenida en patatas tipo “french”, empleando oleina de palma. *Grasas y Aceites*, pp 24-29.
 - ✓ Marchetti J., Errazu M. 2008. Technoeconomic of different alternatives for biodiesel production. *Fuel Processing Technology* 89: 740-748.
 - ✓ Meher LC, Sagar DV, Naik SN. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renew Sustain Energy Rev.* 10, 248-268.
 - ✓ Meng, L. y Salihon J. 2011. Conversión de aceite de palma a etil y metil ester usando encimas crudas. *Biotechnology & Biomaterials* (1-5)
 - ✓ Merino, L.; O’Halon, B. 1990. Población y medio ambiente en Costa Rica (en línea). Asociación Demográfica Costarricense. San José, CR. 16 p. Disponible en <http://ccp.ucr.ac.cr/bvp/pdf/medioambiente/poma1990.pdf>
 - ✓ Norma ASTM D 6751. 2008. “Especificación para mezclas de combustible biodiésel (B100) y para combustibles de destilación intermedia”.
 - ✓ Norma DIN-V 51606. 1994. Requisitos para combustibles líquidos y combustible diesel de ésteres metílicos de aceites vegetales”.
 - ✓ Norma EN 14214. 2003. “Combustibles de automoción. Ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) para motores diesel. Requisitos y métodos de ensayo”.
 - ✓ Norma ISO 5909. 2000. “Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids”.

-
- ✓ Norma ISO 6800. 1997. "Animal and vegetable fats and oils — Determination of the composition of fatty acids in the 2-position of the triglyceride molecules".
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 2001. Aceites y grasas. Densidad relativa a 20°C N° 703-01. Fondonorma. Venezuela
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 2001. Aceites y grasas. Índice de acidez N° 325-01. Fondonorma. Venezuela
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 2001. Aceites y grasas. Índice de saponificación N° 323-98. Fondonorma. Venezuela.
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 1999. Aceite comestible de girasol. N° 1272-99. Fondonorma. Venezuela.
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 1999. Aceite comestible de soya. N° 744-99. Fondonorma. Venezuela.
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 2000. Aceite comestible de palma. N° 2953-00. Fondonorma. Venezuela.
 - ✓ Normas Venezolanas Covenin. 2002. Aceite comestible de maíz. N° 743-02. Fondonorma. Venezuela.
 - ✓ Otero, C., Dave, Baeza, R., González, J. y López, L. 2010. Producción enzimática de biodiesel a partir de aceites residuales. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Acapulco, México.
 - ✓ Rivera I., Villanueva G. y Sandoval G. 2009. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. *Grasas y Aceites*. 60 (5). pp 468-474.
 - ✓ Rodrigues Machado E, Marmesat S, Abrantes S, Dobarganes MC. 2007. Uncontrolled variables in frying studies: differences in repeatability between thermoxidation and frying experiments. *Grasas y Aceites* 58, 283-288.
 - ✓ Rojas, A., Girón, E., Torres H. 2010. Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión

catálisis enzimática. Ingeniería e Investigación. Vol. 30 N° 1, Abril 2010(17-21)

- ✓ Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol.* 98, 648-653
- ✓ Shimada Y.; Watanabe Y., Sugihara, A y Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17 133–142
- ✓ Shweta S., y Gupta M. 2004. Biodiésel Preparation by Lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. *energy & fuel of Jatropha oil*, Vol. 18, p. 154-159.
- ✓ Stiefel, S., Dassori, G. 2009. Simulation of biodiesel production through transesterification of vegetable oils. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48(3), 1068–1071
- ✓ Tan, T.W., Nie, K.L., Wang, F. 2006. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp lipase at high water content. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 128(2), 109–116
- ✓ Varela G. 1985. Current facts about the frying of Foods. In: *Frying of Foods*, chap. 1, 9-25. Ed: Varela G., Bender A.E., Morton, I.D., VCH Chichester, England. Rodrigues Machado E, Marmesat S, Abrantes S, Dobarganes MC. 2007. Uncontrolled variables in frying studies: differences in repeatability between thermoxidation and frying experiments. *Grasas y Aceites* 58, 283-288.
- ✓ Varty, A. y Lishawa, S. 2008. Haciendo biodiesel de aceite vegetal usado. Disponible en: <http://www.greenteacher.com/articles/haciendobiodiesel.pdf>, Consultado en Enero 2013.

- ✓ Vicente, G., Martínez, M., Aracil, J. 2006. Kinetics of Brassica carinata oil methanolysis. Energy Fuels 20(4), 1722–1726
- ✓ Zapata, P. y Mendoza, R. 2003. Obtención de biocombustible mediante la transesterificación del aceite de palma con etanol. Medellín, 2003, 154 p.
- ✓ Zhang X, Peterson C, Reece D, Haws R, Moller G. 1998. Biodegradability of biodiesel in aquatic environment, Transactions of the American Society of Engineers, St. Joseph, Mich. 41(5) 1423-1430.

Páginas web consultadas:

www.astm.org, consultada en Enero, 2013.

www.fedebiocombustibles.com, consultada en Enero 2013.

www.novozymes.com, consultada en Agosto 2012.

www.sigmaaldrich.com, consultada en Enero 2013.

APÉNDICE A

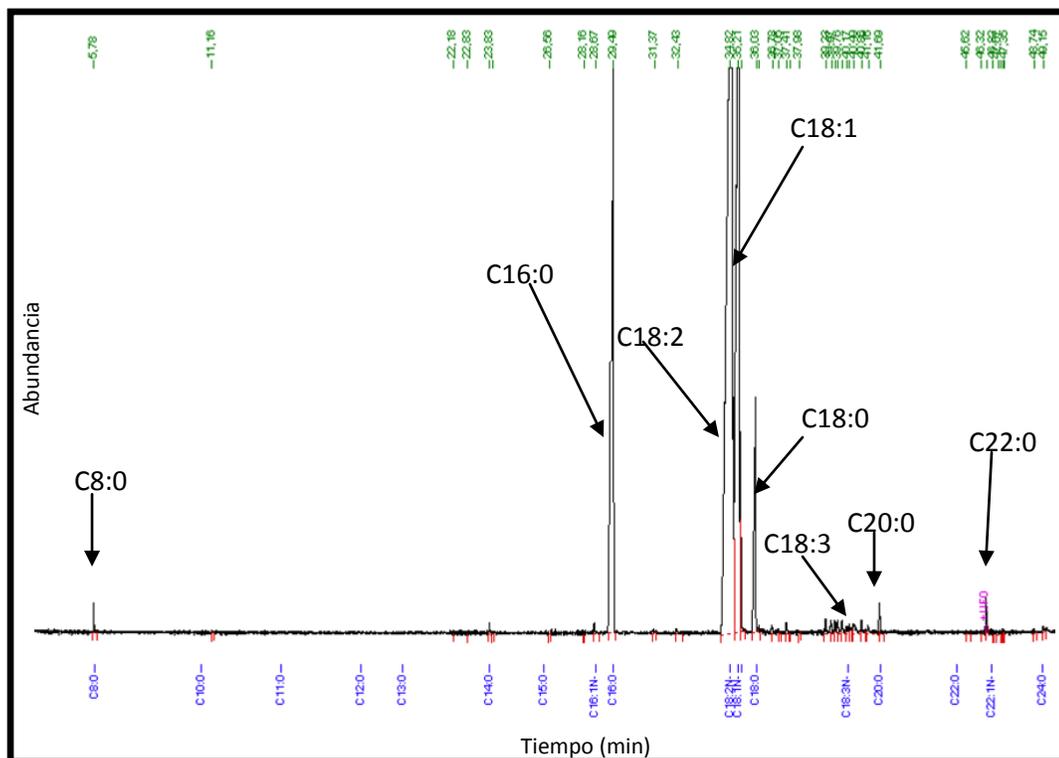


Figura A.1 Cromatograma de los ésteres metílicos del aceite vegetal original

Tabla A1. Cuantificación de ácidos grasos presentes en el aceite vegetal

| Éster Metílico | Tiempo (min) | Área | Porcentaje ($\pm 0,01$)% |
|--------------------|--------------|-------------|----------------------------|
| C8:0 | 5,78 | 104022,718 | 0,25 |
| C16:0 | 29,49 | 5928568,127 | 14,49 |
| C18:2 | 34,82 | 20442696,11 | 49,97 |
| C18:1 | 35,21 | 11963293,22 | 29,25 |
| C18:0 | 36,03 | 2089868,153 | 5,11 |
| C18:3 | 40,17 | 109848,352 | 0,27 |
| C20:0 | 41,69 | 201557,919 | 0,49 |
| C22:0 | 45,62 | 67086,679 | 0,16 |
| Área Total: | | 40906941,28 | |

APÉNDICE B
TABLAS DE DATOS

Tabla B.2 Datos para la determinación de las propiedades fisico-químicas del biodiesel obtenido vía catálisis enzimática

| Reacción | Masa del picnómetro lleno ($m \pm 0,0001$)g | | Tiempo de descenso del menisco en el viscosímetro ($t \pm 0,01$)min | | | | | |
|----------|--|--------|--|------|------|------|------|------|
| | A | B | a | | | b | | |
| 1 | 9,3627 | 9,3627 | 2,34 | 2,34 | 2,34 | 2,34 | 2,34 | 2,34 |
| 2 | 9,4593 | 9,4593 | 3,31 | 3,31 | 3,31 | 3,31 | 3,31 | 3,31 |
| 3 | 9,3782 | 9,3782 | 2,32 | 2,32 | 2,32 | 2,32 | 2,32 | 2,32 |
| 4 | 9,4632 | 9,4632 | 3,04 | 3,04 | 3,04 | 3,04 | 3,04 | 3,04 |
| 5 | 9,4527 | 9,4527 | 2,34 | 2,34 | 2,34 | 2,34 | 2,34 | 2,34 |
| 6 | 9,3514 | 9,3514 | 2,42 | 2,42 | 2,42 | 2,42 | 2,42 | 2,42 |
| 7 | 9,4632 | 9,4632 | 3,38 | 3,38 | 3,38 | 3,38 | 3,38 | 3,38 |
| 8 | 9,3715 | 9,3715 | 2,29 | 2,29 | 2,29 | 2,29 | 2,29 | 2,29 |

Observaciones: Los análisis se realizaron por duplicado es por ello que se presentan dos columnas para cada experimento realizado. Temperatura ambiente ($27,0 \pm 0,5$)°C, Masa del picnómetro vacío y seco ($7,7315 \pm 0,0001$)g, Volumen del picnómetro: 2mL, Tempertura del baño: ($40 \pm 0,5$)°C.

APÉNDICE C
TABLAS DE RESULTADOS

Tabla C.1 Densidad y viscosidad del biodiesel obtenido vía catálisis enzimática

| Reacción | Densidad promedio (±Error)Kg/m³ | Viscosidad promedio (±Error)mm²/s |
|-----------------|---|---|
| 1 | 816,0±0,5 | 0,99±0,01 |
| 2 | 863±0,1 | 1,26±0,10 |
| 3 | 822±0,2 | 0,98±0,01 |
| 4 | 865,6±0,1 | 1,180±0,003 |
| 5 | 860,6±0,1 | 0,99±0,01 |
| 6 | 810,2±0,4 | 1,03±0,01 |
| 7 | 865,9±0,1 | 1,4±0,1 |
| 8 | 823±0,2 | 0,97±0,02 |

APÉNDICE D

FÓRMULAS MATEMÁTICAS EMPLEADAS

D.1 Caracterización de la matriz grasa

D.1.1 Densidad relativa a 20°C

$$Dr / 20^{\circ}C = \frac{M_2}{M_1 [1 + \alpha (t^{\circ} - 20^{\circ}C)]} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

Dr : Densidad relativa

M_2 : Masa de grasa o aceite obtenida en el ensayo, (g)

M_1 : Masa de agua, (g)

α : Coeficiente de dilatación cubica del vidrio a la temperatura dada. Para este caso especifico

$\alpha = 0,00001$, por ser un picnómetro de vidrio borosilicato

D.1.2 Índice de acidez

$$\%A = \frac{0.256 * V * N * 100}{G} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

A : Acidez expresada como ácido palmítico, (%)

V : Volumen de la solución de NaOH gastado en la valoración de la muestra, (mL)

N : Normalidad de la solución de NaOH, (Eq/L)

G : Masa de la muestra de aceite, (g)

256 : Peso molecular del ácido palmítico

El índice de acidez (Ia) como ácido palmítico se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$Ia = (2,19) * (\%A) \quad (\text{Ec. 3})$$

D.1.3. Índice de saponificación

$$VS = \frac{56,1 * V_B - V_A * N}{G} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

VS : Valor de saponificación

V_B : Volumen de solución de HCl gastado en la valoración del ensayo en blanco, (mL)

V_A : Volumen de la solución de HCl gastado en la valoración de la muestra, (mL)

N : Normalidad de la solución de HCl, (Eq/L)

G : Masa de la muestra, (g)

56,1: Peso molecular del KOH

D.1.4 Determinación del porcentaje de éster metílico en la muestra de aceite (se empleó la misma fórmula para el caso del Biodiesel).

$$\text{Porcentaje del éster metílico} = \frac{\text{Área del éster metílico}}{\text{Área total}} * 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

D.2 Caracterización del Biodiesel

D.2.1 Densidad por picnometría a 15°C

$$\rho = \frac{m_{fl} - m_{vac}}{V} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

ρ : Densidad de la muestra obtenida, (g/mL)

m : Masa de la muestra, (g)

V : Volumen de la muestra, (mL)

D.2.2 Valor promedio de un rango de valores

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

\bar{X} : Valor promedio del rango

X_i : Valor puntual

n : Número de valores dentro del rango

Utilizando la ecuación (VII) se obtiene la densidad

D.2.3 Determinación de la desviación estándar para cada uno de los resultados obtenidos

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X} - X_i)^2}{n}} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

\bar{X} : Valor promedio del rango

X_i : Valor puntual

n : Número de valores dentro del rango

S : Desviación estándar

D.2.4 Rendimiento de la reacción de transesterificación

$$\%R = \left(\frac{\text{Cantidad de Acido Linoico (Biodiesel)}}{\text{Cantidad de Acido Linoico (Aceite)}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

D.2.5 Determinación de la viscosidad cinemática

$$\mu_{cinematica} = \frac{\mu_{dinamica}}{\rho_{bio}} * FC \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

$\mu_{cinematica}$: Viscosidad cinemática del biodiesel (mm²/s)

$\mu_{dinamica}$: Viscosidad dinámica del biodiesel (Kg/m.s)

ρ_{bio} : Densidad del biodiesel (Kg/m³)

FC : Factor de corrección del viscosímetro (0,006 a 40°C)

APÉNDICE E

ENCUESTA



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología
(FACyT)
Facultad de Ingeniería
Dirección de Postgrado



ENCUESTA

Con el fin de evaluar la cantidad y la disposición del aceite vegetal que se consume en los comercios ubicados en el sector el Palito, municipio Puerto Cabello parroquia Juan José Flores, se procede a realizar la siguiente encuesta.

Coloque una x en la selección o selecciones que considere:

1. ¿Qué cantidad de días a la semana elabora alimentos fritos?
2___, 3___, 4___, 5___, 6___, 7___.
2. ¿Qué tipo de alimentos elabora?
Empanadas___, Papitas fritas___, Arepas___, Pescados___ otros_____.
3. ¿Qué tipo de grasa utiliza?
Manteca vegetal___, Aceite___, La mezcla de las dos___.
4. ¿Qué cantidad de grasa emplea diariamente?
1L___, 2L___, 5L___, 10___, 15___, mas___.
5. ¿Con que frecuencia añade nuevamente grasa durante el proceso de fritura?
Una___, Dos___, Tres___, Cuatro___.
6. ¿Dónde dispone la grasa para desecharla?
La agrega por la cañería___, la guarda en envases plástico y la desecha___, la almacena en su casa___, la desecha en el suelo___, la descarta en el río___.
7. ¿Cree Ud. Que la grasa que desecha cause algún impacto ambiental?
Si___, No___ . Si la respuesta es **SI**, diga cual_____.

Gracias por su colaboración

APENDICE F
CALCULOS TÍPICOS

F.1 CÁLCULO DE CANTIDAD DE REACTIVO NECESARIO PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL VÍA CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Cálculo de los moles de Aceite Vegetal Usado:

Partiendo de 30mL de Aceite, cuya densidad es de 0,9415g/mL y tomando en cuenta el peso molecular del ácido graso de mayor proporción en el aceite; Ácido Linoléico el cual es 278,43g/mol, se tiene que:

$$60\text{mL de Aceite} * \left(\frac{0,9415 \text{ g de Aceite}}{1\text{mL de Aceite}} \right) * \left(\frac{1\text{mol de Aceite}}{278,43\text{g Aceite}} \right) = 0,203 \text{ moles de Aceite}$$

Cálculo de la cantidad de Metanol utilizado:

La densidad del Metanol es 0,7866g/mL y el peso molecular 32g/mol.

Tomando en cuenta la Relación molar Aceite:Metanol 1:2, se tiene que:

$$0,203\text{moles de Aceite} * \left(\frac{2\text{moles de Metanol}}{1\text{mol de Aceite}} \right) * \left(\frac{32\text{g Metanol}}{1\text{mol de Metanol}} \right) * \left(\frac{1\text{mL de Metanol}}{0,7866\text{g Metanol}} \right) = 16,51\text{mL de Metanol}$$

Tomando en cuenta la Relación molar Aceite:Metanol 1:1, se tiene que:

$$0,203\text{moles de Aceite} * \left(\frac{1\text{moles de Metanol}}{1\text{mol de Aceite}} \right) * \left(\frac{32\text{g Metanol}}{1\text{mol de Metanol}} \right) * \left(\frac{1\text{mL de Metanol}}{0,7866\text{g Metanol}} \right) = 8,23\text{mL de Metanol}$$