

**Obtención de biodiésel a partir de aceite de pescado utilizando como catalizador lipasas
inmovilizadas**

Jonny Javier Ching Velasquez

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero Químico

Director:

Vladimir Plata Chávez

Ph. D. en Ingeniería Química

Codirector:

Beatriz Torrestiana Sanchez

Ph. D. en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander y a la escuela de Ingeniería Química por brindarme todo su conocimiento que me permitieron formar profesionalmente.

Al profesor Vladimir Plata Chávez, por permitirme trabajar con él, por el apoyo y orientación para el desarrollo de este proyecto.

A la profesora Beatriz Torrestiana Sánchez, por brindarme el apoyo, los conocimientos y la oportunidad de realizar la pasantía en su laboratorio.

A la Doctora Veymar Tacias Pascacio por su recibimiento, incondicional apoyo y por compartir su conocimiento para este proyecto.

A la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) por toda la colaboración prestada para la ejecución de este trabajo.

Al Polo Tecnológico de Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por la colaboración en la fase experimental.

Al Ingeniero Guillermo Acero por su colaboración en la realización de pruebas complementarias.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio de Bioprocesos de la UNIDA que hicieron de la pasantía una grata experiencia.

Dedicatoria

A Dios por guiarme en el camino correcto.

A mis padres, por creer en mí y por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi hermana Sofia, por ser la motivación para lograr mis metas.

A mi abuela Elvia y mi tía Deisi por el apoyo y motivación durante este proceso de formación.

A mi tío Roberto quien muy acertadamente me guio para estudiar esta profesión con sus valiosos
consejos.

A mis amigos y compañeros, por estar siempre en las situaciones adversas y en los gratos
momentos.

A las personas que de una u otra manera me brindaron su colaboración.

Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	20
1.1 Objetivo General	20
1.2 Objetivos Específicos.....	20
2. Metodología	21
2.1 Caracterización de la materia prima	22
2.2 Obtención de biodiésel.....	23
2.2.1 Diseño experimental.	23
2.2.2 Reacción de transesterificación.....	26
2.2.3 Análisis estadístico.....	26
2.2.4 Caracterización del biodiésel.	27
3. Resultados y Análisis.....	28
3.1 Caracterización de la materia prima	28
3.2 Obtención de biodiésel.....	30
3.2.1 Reacción de transesterificación.....	30
3.2.2 Análisis estadístico.....	31
3.2.2.1 Efecto de los factores sobre el contenido de FAMES.	33
3.3 Validación del modelo para el contenido de fames del biodiésel	38

3.4 Caracterización del biodiésel	38
4. Conclusiones	42
5. Recomendaciones	43
Referencias Bibliográficas	44
Apéndices.....	55

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Diagrama de las actividades a investigar.....	21
<i>Figura 2.</i> Diagrama de Pareto estandarizado para el contenido de FAME	32
<i>Figura 3.</i> Diagrama de efectos principales para Y	34
<i>Figura 4.</i> Diagrama de interacciones para Y.	34
<i>Figura 5.</i> Superficie de respuesta estimada X1 – X2 Vs contenido de FAMEs.....	36
<i>Figura 6.</i> Superficie de respuesta estimada X1 – X3 Vs Contenido de FAMEs.....	36
<i>Figura 7.</i> Superficie de respuesta estimada X2 – X3 Vs contenido de FAMEs.....	37
<i>Figura 8.</i> Cinética de reacción de la producción de biodiésel.....	41

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Descripción de propiedades para la caracterización de materia prima</i>	22
Tabla 2. <i>Factores y niveles de las variables independientes del proceso para la producción de biodiésel.</i>	25
Tabla 3. <i>Matriz del diseño factorial central compuesto</i>	25
Tabla 4. <i>Descripción de propiedades para la caracterización del biodiésel obtenido para el punto de validación.</i>	27
Tabla 5. <i>Perfil de ácidos grasos del aceite de residuos de pescado</i>	28
Tabla 6. <i>Propiedades del aceite de residuos de pescado</i>	30
Tabla 7. <i>Contenido de FAMEs para el diseño central compuesto</i>	31
Tabla 8. <i>Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño central compuesto</i>	32
Tabla 9. <i>Determinación del modelo Y, Selección hacia atrás</i>	35
Tabla 10. <i>Experimentos de confirmación para validar la predicción del modelo de regresión para el contenido de FAMEs del biodiésel de aceite de residuos de pescado.</i>	38
Tabla 11. <i>Propiedades del biodiésel de residuos de pescado</i>	39

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Proceso de extracción del ARP.....	55
Apéndice B. Condiciones de cromatografía para la determinación del perfil de ácidos grasos. ..	56
Apéndice C. Perfil cromatográfico de ARP.....	57
Apéndice D. Condiciones de cromatografía para la determinación del contenido de Fames.....	58
Apéndice E. Norma UNE-EN 14214:2013. Esta norma europea especifica los requerimientos y los métodos de ensayo de los FAME, para determinar la calidad de un biodiésel.	59
Apéndice F. Norma ASTM D6751-09. Esta norma americana especifica los requerimientos y los métodos de ensayo de los FAME, para determinar la calidad de un biodiésel.	61

Glosario

AGL: Ácidos grasos libres

ARP: Aceite de residuos de pescado

ASTM: Sociedad Americana de pruebas y materiales (American Society for Testing and Materials)

BARP: Biodiésel de aceite de residuos de pescado

DCC: Diseño factorial central compuesto

F: Prueba de significancia

FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos (Fatty Acid Methyl Esters)

FID: Detector de ionización en llama (Flame Ionization Detector)

GC: Cromatografía de gases (Gas Chromatography)

H: hora

HPLC-RID: Cromatografía líquida de alto rendimiento - Detector de índice de refracción (High-Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector)

IS: Índice de saponificación

IA: Índice de acidez

Max: Máximo

Min: Mínimo

NTC: Norma técnica colombiana

p: Probabilidad de error

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids)

rpm: Revoluciones por minuto

TLL: *Thermomyces lanuginosus*

UNE-EN-ISO: Una Norma Española - European Norm - International Standarization

Organization

%p/p: Porcentaje en peso

%R: Rendimiento

Resumen

TÍTULO: OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE ACEITE DE PESCADO UTILIZANDO COMO CATALIZADOR LIPASAS INMOVILIZADAS*

AUTOR: JONNY JAVIER CHING VELASQUEZ**

PALABRAS CLAVE: Aceite de residuos de pescado, Lipasa TLL, transesterificación enzimática, FAMES, metodología superficie de respuesta.

DESCRIPCIÓN:

La industria pesquera genera alrededor de 76 millones de toneladas al año de desechos de pescado y su eliminación indiscriminada representa una amenaza para el medio ambiente. Debido a esto, en este trabajo se usó aceite de residuos de pescado (ARP) como materia prima para la producción de biodiésel, utilizando como biocatalizador la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (TLL) inmovilizada en Metacrilato de octadecilo. Se evaluó el efecto de los parámetros de transesterificación enzimática sobre el contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) del biodiésel, incluida la temperatura (30 – 40 °C), el contenido de biocatalizador (5 – 10 %p/p) y la velocidad de agitación (250 – 350 rpm). Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo de segundo orden y se determinaron los rangos más favorables para la producción de biodiésel mediante la metodología de superficie de respuesta. El biodiésel obtenido se caracterizó de acuerdo a las especificaciones de las normas UNE-EN 14214 Y ASTM D6751. El ARP se obtuvo con un rendimiento de 74,63%. La región donde se encontró que el contenido de FAMES es mayor que 70% se extiende desde 30 hasta 35 °C para una concentración de biocatalizador de 8,8 %p/p y 300 rpm. Se reportaron propiedades del biodiésel como, la densidad (0,89 g/ml), la viscosidad (5,32 mm²/s), índice de acidez (0,93 mg KOH/g aceite), estabilidad oxidativa (0,09 h), etc. Se estableció que la reacción supera el 70%p/p de FAMES después de 6 h y por tanto no es necesario prolongarla hasta las 24 h.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph. D. Vladimir Plata Chávez. Unidad de Investigación en Desarrollo de Alimentos. Codirector: Ph.D. Beatriz Torrestiana Sánchez

Abstract

TITLE: PROCUREMENT OF BIODIESEL FROM OIL FISH USING IMMOBILIZED LIPASE CATALYST*

AUTHOR: JONNY JAVIER CHING VELASQUEZ**

KEYWORDS: Waste fish oil, TLL lipase, enzymatic transesterification, FAMES, response surface methodology.

DESCRIPTION

Fishing industry generates around 76 million tonnes per year of waste fish and its indiscriminate disposal represents an environment threat. In this work waste fish oil (W F O) was used as raw material for biodiesel production, using a lipase biocatalyst from *Thermomyces lanuginosus* (T L L) immobilized on octadecyl methacrylate. The effect of enzymatic transesterification parameters such as temperature (30 - 40 °C), biocatalyst concentration (5 - 10 %w/w) and stirring rate (250 - 350 rpm) were evaluated on the content of fatty acid methyl esters (FAME) of biodiesel. Obtained results were fit to a second order model and the best operating conditions for biodiesel production determined by response surface methodology. Biodiesel obtained was characterized according to the specifications of UNE-EN 14214 and ASTM D6751 standards. The yield of WFO obtained was 74.63%. The region where FAME content was over 70% varied from 30 to 35 ° C, 8.8 %w/w biocatalyst and 300 rpm. The properties of Biodiesel obtained were, density (0.89 g / ml), viscosity (5.32 mm² / s), acid number (0.93 mg KOH / g oil) and oxidative stability (0.09 h). The reaction exceeds 70% w/w of FAME after 6 h, then there was no need to continue until 24 h.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph. D. Vladimir Plata Chávez. Unidad de Investigación en Desarrollo de Alimentos. Codirector: Ph.D. Beatriz Torrestiana Sánchez

Introducción

Los ésteres monoalquílicos de ácidos grasos, también denominados biodiésel, son derivados de materiales naturales renovables, como aceites vegetales o grasas animales, y utilizados como combustible para motores de vehículos (Lin & Li, 2009a; Menegazzo, Franco Lucas, Boarin Alcade, Petenucci, & Graciano Fonseca, 2015; Plata, Haagenson, Dağdelen, Wiesenborn, & Kafarov, 2015; Saleh, Tremblay, & Dubé, 2010). El biodiésel posee propiedades fisicoquímicas similares al combustible diésel y presenta ventajas, como biodegradabilidad, baja toxicidad (Charpe & Rathod, 2011; Huong, Tan, & Hoa, 2011; Yahyaei, Ghobadian, & Najafi, 2013), potencial de lubricidad inherente, puntos de inflamación más altos, contenidos insignificantes de azufre y reducción de las emisiones contaminantes (Atadashi, Aroua, & Aziz, 2010; Fiori et al., 2017; Fukuda, Kondo, & Noda, 2001; Jayasinghe & Hawboldt, 2012).

El biodiésel se produce principalmente a partir de aceites vegetales comestibles, como los aceites de soya, girasol, colza o canola, ya que permiten producir un biodiésel con propiedades similares al diésel. Sin embargo, el alto costo de estas materias primas hacen al biodiésel económicamente no competitivo contra el diésel. Además, el uso de materias primas comestibles en la producción de combustibles podría generar problemas sociales y ambientales, tales como el alza en el precio de los alimentos, la competencia por la tierra y el agua, y la deforestación, especialmente en los países en desarrollo (Canesin et al., 2014; Dias et al., 2013; Hong, Park, & Lee, 2013; Jayasinghe & Hawboldt, 2012; Sakthivel, Nagarajan, Ilangkumaran, & Gaikwad, 2014; Serna, Barrera, & Montiel, 2011). Esta situación llevó a la búsqueda y uso de materias primas

alternativas como aceites vegetales no comestibles (aceite de ricino, jatropha, semilla de algodón, semilla de caucho y otros) (Ali, Mashud, Rubel, & Ahmad, 2013; Arumugam & Ponnusami, 2017; Fernandez-Lafuente, 2010; Patel & Sankhavara, 2017; Yahyaee et al., 2013), aceites usados de cocina (Farooq, Ramli, & Naeem, 2015; Huong et al., 2011; Mahesh, Ramanathan, Begum, & Narayanan, 2015) y grasas animales (Banković-Ilić, Stojković, Stamenković, Veljkovic, & Hung, 2014; da Cunha et al., 2009; Sousa, Luz, Caldeira-Pires, S. Machado, & M. Silveira, 2017).

Las grasas animales son principalmente obtenidas de los subproductos de tejidos animales durante su procesamiento para la comercialización de la carne. Las principales grasas animales incluyen sebo de res, manteca de cerdo, grasa de aves (Adewale, Dumont, & Ngadi, 2015; Chakraborty, Gupta, & Chowdhury, 2014; Soegiantoro, Chang, Rahmawati, Christiani, & Mufrodi, 2019), y aceite de pescado de la industria pesquera (Fadhil, Al-Tikrity, & Albadree, 2017; García-Moreno, Khanum, Guadix, & Guadix, 2014; Gharehghani, Mirsalim, & Hosseini, 2017; Iastiaque Martins et al., 2015; Serrano, Marchetti, Martínez, & José, 2015).

La industria pesquera genera una gran cantidad de residuos y su eliminación indiscriminada representa una amenaza para el medio ambiente (Arumugam & Ponnusami, 2017; FT, LEC, & ML, 2003; Kara et al., 2018). Según la Organización para la Agricultura y la Alimentación, en el 2016 la producción pesquera mundial alcanzó un máximo de aproximadamente 171 millones de toneladas, de las cuales el 88% se destinó al consumo humano y el resto se utilizó para productos no alimentarios (FAO, 2018). Aproximadamente el 50% del volumen total de pescado se descarta durante el procesamiento, lo que significa que para ese año se generaron alrededor de 76 millones de toneladas de desechos de pescado. Estos subproductos de la industria pesquera se clasifican como residuos (cabeza, cola, aletas, vísceras y piel), y se ha reportado que contienen aproximadamente entre 40% y 65% de aceite, que puede ser usado para la producción de biodiésel

(Iastiaque Martins et al., 2015; G. I. Martins et al., 2015; Wisniewski Jr et al., 2010; Yahyaee et al., 2013).

La transesterificación es la reacción más utilizada en la producción de biodiésel; en esta reacción, el aceite o grasa reacciona con un alcohol (metanol o etanol) en presencia de un catalizador ácido, básico o enzimático (Ehsan & Chowdhury, 2015; Menegazzo et al., 2015; Jakeline K. Poppe et al., 2013). Los catalizadores alcalinos como KOH, NaOH o metóxido de sodio (NaOCH_3) son los más utilizados para la producción de biodiésel debido a una alta conversión en un corto tiempo (García-Moreno et al., 2014; Hameed, Lai, & Chin, 2009; Lin & Li, 2009b; Jakeline K. Poppe et al., 2013; Jakeline Kathiele Poppe, Matte, Fernandez-Lafuente, Rodrigues, & Ayub, 2018); sin embargo, este tipo de catalizadores tiene grandes desventajas, como su alta sensibilidad a la pureza de los reactivos, principalmente el contenido de ácidos grasos libres (AGL) y contenido de agua. La presencia de estas impurezas puede neutralizar el catalizador y llevar a la formación de jabón, disminuyendo los rendimientos de la reacción y complicando los procesos posteriores de purificación (Aguieiras, de Barros, Sousa, Fernandez-Lafuente, & Freire, 2017; F. Ma & Hanna, 1999; Meher, Vidya Sagar, & Naik, 2006).

Los inconvenientes previamente mencionados se pueden superar mediante el uso de catalizadores ácidos (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido sulfónico) (Abbaszaadeh, Ghobadian, Omidkhah, & Najafi, 2012; Serrano et al., 2015) que no se desactivan por la presencia de AGL, ya que pueden catalizar reacciones de esterificación y transesterificación simultáneamente (Cerveró, Coca, & Luque, 2008). Sin embargo, su uso es limitado porque la velocidad de reacción llega a ser 4000 veces más baja con respecto a la catálisis alcalina. Además los catalizadores ácidos son sensibles a la presencia de humedad, requieren un mayor exceso molar de alcohol para alcanzar buenos rendimientos y es necesario usar equipos especiales resistentes a

la corrosión (Enweremadu & Mbarawa, 2009). La biocatálisis surge como una alternativa para superar las desventajas de los catalizadores químicos; las enzimas son más tolerantes a las variaciones en la calidad del aceite, la demanda de energía es menor debido a las condiciones moderadas en que ocurren sus reacciones, pueden catalizar la esterificación y transesterificación simultáneamente, la reacción no genera subproductos y la recuperación del producto es más fácil, con una baja cantidad de efluentes en el proceso de purificación (Fjerbaek Søtof, Christensen, & Norddahl, 2009; Guldhe, Singh, Mutanda, Permaul, & Bux, 2015; G. Ma, Dai, Liu, & Du, 2018). A pesar de las ventajas nombradas anteriormente, el uso de la catálisis enzimática es limitado, principalmente por su costo en comparación con el catalizador químico. Además, la transesterificación catalizada por enzimas es más lenta que con los catalizadores alcalinos, y las enzimas pueden ser inhibidas o inactivadas por los alcoholes utilizados como sustrato (principalmente metanol) y por la presencia del glicerol producido en la reacción. (Jakeline K. Poppe et al., 2013; Robles-Medina, González-Moreno, Esteban-Cerdán, & Molina-Grima, 2009; Shah, Sharma, & Gupta, 2004). Entre las enzimas, las lipasas son las más utilizadas en la producción de biodiésel, ya sea en forma libre o inmovilizada, en sistemas libres de solventes (Canet, Dolors Benaiges, & Valero, 2014; Li et al., 2012; Liu, Huang, Wang, Lee, & Chang, 2012), o utilizando diferentes codisolventes como disolventes orgánicos (n-hexano, terbutanol), líquidos iónicos o fluidos supercríticos (Azócar, Navia, Beroiz, Jeison, & Ciudad, 2014; Lozano, Bernal, Sánchez-Gómez, López-López, & Vaultier, 2013). El alto costo de las enzimas hace que su reutilización sea esencial; por esta razón, se prefiere el uso de enzimas inmovilizadas en lugar de enzimas libres (Jegannathan, Abang, Poncelet, Chan, & Ravindra, 2008; Lima et al., 2015). Además de permitir su reutilización en lotes sucesivos o en procesos continuos, una adecuada inmovilización de la enzima tiene otras ventajas, como el aumento de la actividad o la estabilidad

enzimática, la protección de la enzima contra la inactivación cuando se usan soportes hidrófobos, ya que reducen la absorción de glicerol (A. B. Martins et al., 2013; Marín-Suárez, Méndez-Mateos, Guadix, & Guadix, 2019); la pureza de la enzima y la resistencia a las condiciones de inhibición o distorsión pueden aumentar, etc (Barbosa et al., 2015; Barbosa, Ortiz, Torres, & Fernandez-Lafuente, 2011; Rodrigues, Ortiz, Berenguer-Murcia, Torres, & Fernández-Lafuente, 2013). Una de las enzimas más utilizadas en la industria de la biocatálisis es la lipasa 1,3 estereoespecífica de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Esta enzima se usa principalmente en la modificación de grasas y aceites, pero también se ha usado en procesos como la obtención de enantiómeros puros o regioisómeros (principalmente en modificaciones de azúcares) y la producción de biodiésel (Fernandez-Lafuente, 2010), Tacias-Pascacio *et al.* (2016) reportaron que la inmovilización de lipasa TLL en el soporte hidrofóbico metacrilato de octadecilo (Purolite®) (Tacias Pascacio, Rosales Quintero, & Torrestiana Sánchez, 2016) mejora considerablemente su rendimiento en la producción de biodiésel a partir de aceites residuales de cocina, generando rendimientos superiores a los obtenidos con preparaciones comerciales de ésta y otras enzimas (Tacias-Pascacio et al., 2017). De hecho, muy recientemente se ha reportado una comparación de los diferentes tipos de catalizadores químicos (KOH, CaO y H₂SO₄) con este nuevo biocatalizador TLL de metacrilato de octadecilo en la producción de biodiésel a partir de aceite residual de cocina (Tacias-Pascacio et al., 2019). En ese estudio, se encontró que el nuevo biocatalizador de TLL superó la catálisis heterogénea o la catálisis ácida con la ventaja de que la reacción enzimática fue mucho más limpia y menos exigente de energía que la catálisis química.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se abordó el estudio de la transesterificación enzimática del ARP con metanol, utilizando el biocatalizador desarrollado por Tacias-Pascacio *et al.* (2016). El uso de aceite extraído de vísceras de pescado como materia prima para la producción

de biodiésel, usando TLL en Metacrilato de Octadecilo, no ha sido estudiado por otros investigadores.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar las condiciones de operación más favorables para la producción de biodiésel a partir de aceite de residuos de pescado usando como biocatalizador la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (TLL) inmovilizada.

1.2 Objetivos Específicos

- Acondicionar los aceites de pescado para su uso como materia prima en la producción de biodiésel.
- Evaluar el proceso de transesterificación en diferentes condiciones de operación (temperatura, concentración de biocatalizador y velocidad de agitación) para determinar los rangos más favorables en la producción de biodiésel (% FAMEs > 70%).
- Evaluar la calidad del biodiésel obtenido usando las normas internacionales para la estandarización del producto terminado.

2. Metodología

Se establecieron 4 actividades con el fin de determinar los rangos de operación más favorables para la producción de biodiésel a partir de ARP usando como biocatalizador la lipasa TLL inmovilizada en Metacrilato de Octadecilo (Lifetech™ ECR8806M).

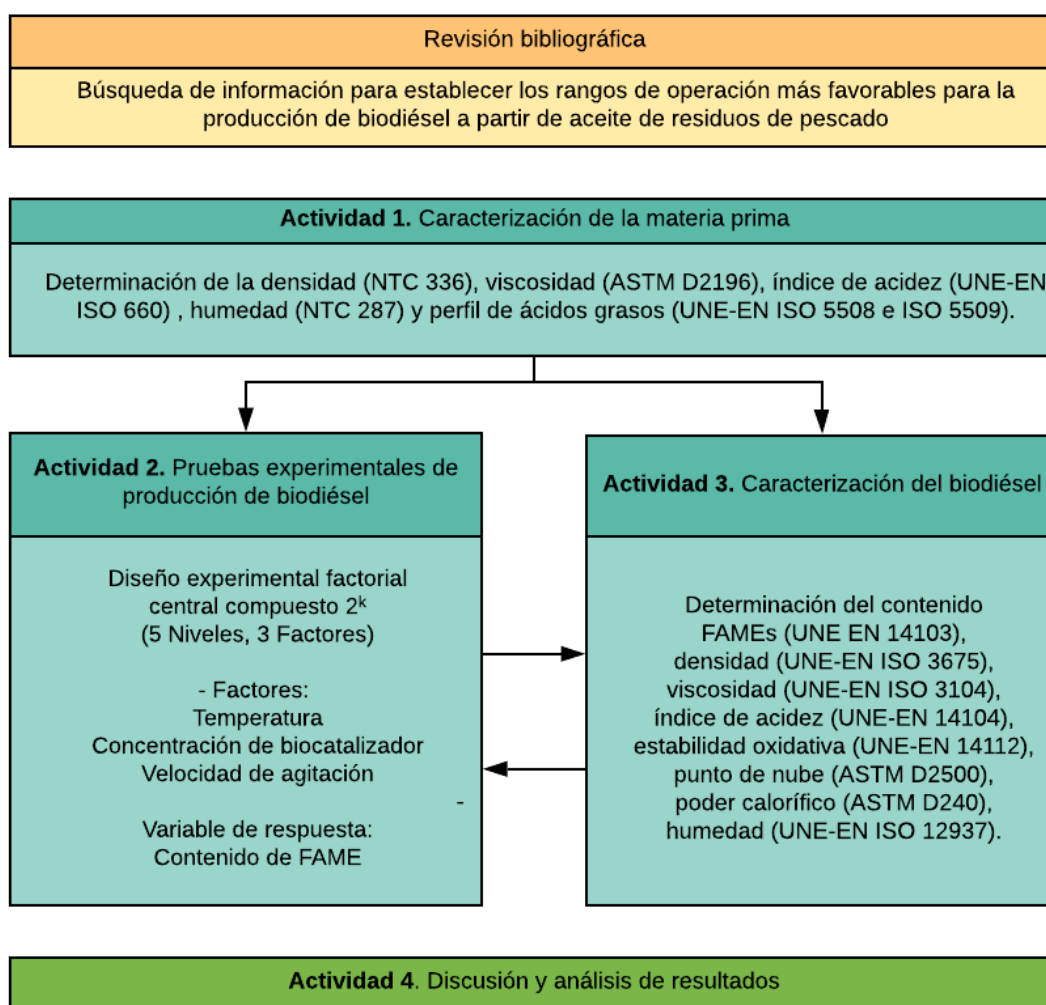


Figura 1. Diagrama de las actividades a investigar.

2.1 Caracterización de la materia prima

La grasa fue obtenida a partir de residuos de pescado que fueron recolectadas en una pescadería local de la ciudad de Veracruz en el estado de Veracruz en México. Los residuos consistían en vísceras de las especies de Robalo prieto (*Centropomus Poeyi*), Chopa (*Spondyllosoma cantharus*), Peto (*Scomberomorus cavalla*) y Mojarra rayada (*Eugerres plumieri*), y fueron lavadas y congeladas a 4°C para usarlas posteriormente. Mediante las técnicas de cocción y prensado (**Ver anexo A**) (Iastiaque Martins et al., 2015; Vidotti, Giovani, & Gonçalves, 2019; Yahyaee et al., 2013), se extrajo la grasa en estado líquido, que en adelante se denominó aceite, y se calculó el rendimiento (%R) en función de la relación entre la masa de aceite (m_o) y la masa de los residuos (m_r) como se muestra en la ecuación 1, expresada en porcentaje (García-Moreno et al., 2014; Iastiaque Martins et al., 2015).

$$\%R = \frac{m_o}{m_r} * 100\% \quad (1)$$

Una vez recolectado el aceite, se sometió a una caracterización en la cual se midieron las propiedades descritas en la tabla 1 y se mantuvo congelado para evitar su degradación.

Tabla 1.

Descripción de propiedades para la caracterización de materia prima

Propiedad	Descripción
Densidad	Se determinó siguiendo la norma NTC 336
Viscosidad	Se midió teniendo en cuenta la norma ASTM D2196, usando un viscosímetro Anton Paar's Stabinger Viscometer™ (Modelo SVM 3000)
Índice de acidez (IA)	Este índice se evaluó siguiendo las indicaciones expuestas en la norma UNE EN ISO 660:2009

Propiedad	Descripción
Índice de saponificación (IS)	Se determinó siguiendo las pautas de la norma UNE EN ISO 3657:2013
Humedad	Se calculó tomando en cuenta el método B de la norma NTC 287, en una balanza analítica Sartorius BL120S Basic Lite
Peso molecular (PM)	Se calculó usando la ecuación $PM = 168000/IS$, según lo reportado por Rodríguez <i>et al.</i> (2016) (Rodríguez Arzave, Hernández Torres, Estrada Garza, & Santoyo Stephano, 2016).
Perfil de ácidos grasos	Se determinó mediante las normas UNE EN ISO 5509:2000 y EN ISO 5508:1990 (Ver anexo B)

2.2 Obtención de biodiésel

2.2.1 Diseño experimental. Se elaboró un diseño central compuesto 2^K + estrella (DCC) de tres factores y cinco niveles para evaluar los efectos de la temperatura, concentración de biocatalizador y velocidad de agitación. La variable de respuesta que se definió fue el contenido de FAME. El DCC tiene la ventaja de pronosticar una respuesta con pocos datos experimentales y se puede ajustar a un modelo de segundo orden, como el descrito en la ecuación 2, permitiendo estudiar, además de los efectos lineales (efectos principales) y de interacción entre factores, los probables efectos cuadráticos o de curvatura pura (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2012; Montgomery, 2006).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Donde Y representa el contenido de FAMES, β_0 la constante, β_i los efectos lineales, β_{ii} los efectos de curvatura, y β_{ij} los efectos de interacción entre factores.

El diseño de este estudio estaba comprendido por 2^k experimentos, n_0 réplicas en el punto central y una porción axial compuesta de $2k$ puntos equidistantes del punto central a una distancia dada por $\alpha=2^{k/4}$ (para 3 factores, $\alpha = 2^{3/4} = 1,682$). Este valor de α hace que el diseño sea rotatable [7-9]. Las réplicas del punto central se evaluaron para determinar la reproducibilidad de los datos y el error experimental (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2012; Montgomery, 2006; Plata, Gauthier-Maradei, & Kafarov, 2015).

En total, se realizaron 17 tratamientos por duplicado: 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 3 réplicas en el punto central. El nivel inferior (-1) de temperatura se escogió teniendo en cuenta las condiciones de trabajo de Tacias *et al.* (Tacias-Pascacio et al., 2017), quienes trabajaron con 30 °C y obtuvieron un contenido de FAME cercano a 79% en la transesterificación enzimática de aceites usados de cocina. El nivel superior (+1) se escogió según lo reportado por Perea *et al.* (Perea, 2007), quienes evidenciaron que las lipasas TLL inician su desnaturalización a una temperatura mayor que 40 °C.

Con respecto a la cantidad de biocatalizador, se fijó como nivel superior (+1) un 10%, valor con el cual trabajaron Tacias *et al.* (Tacias-Pascacio et al., 2017). El nivel inferior (-1) se escogió igual a 5 % con el fin de comprobar si era posible reducir la concentración de biocatalizador sin afectar el rendimiento de la reacción. En cuanto a la velocidad de agitación, se estableció 350 rpm como el nivel superior (+1) para mantener las mismas condiciones de Tacias *et al.* (Tacias-Pascacio et al., 2017), y 250 rpm como nivel inferior (-1) con el fin de favorecer la interacción entre la enzima y el aceite de pescado según lo reportado en otros trabajos (Bocanegra Claudia, Marina Flórez, Enrique López, & Palomino, 2011).

En la tabla 2 detallan los valores que se establecieron para los tres factores. En la tabla 3 se muestra el arreglo compuesto por los diferentes tratamientos del DCC.

Tabla 2.

Factores y niveles de las variables independientes del proceso para la producción de biodiésel.

Factores	Símbolo	Rango y Nivel				
		- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura (°C)	X1	27	30	35	40	43
Concentración de biocatalizador (%p/p)	X2	3	5	7,5	10	12
Velocidad de agitación (rpm)	X3	216	250	300	350	384

Tabla 3.

Matriz del diseño factorial central compuesto

Tratamiento	Temperatura (°C)	Cantidad de biocatalizador (%p/p)	Velocidad de agitación (rpm)
1	30 (-1)	5 (-1)	250 (-1)
2	40 (+1)	5 (-1)	250 (-1)
3	30 (-1)	10 (+)	250 (-1)
4	40 (+1)	10 (+)	250 (-1)
5	30 (-1)	5 (-1)	350 (+1)
6	40 (+1)	5 (-1)	350 (+1)
7	30 (-1)	10 (+)	350 (+1)
8	40 (+1)	10 (+)	350 (+1)
9	27 (- α)*	7,5 (0)	300 (0)
10	43 (+ α)*	7,5 (0)	300 (0)
11	35 (0)	3 (- α)*	300 (0)
12	35 (0)	12 (+ α)*	300 (0)
13	35 (0)	7.5 (0)	216 (- α)*
14	35 (0)	7.5 (0)	384 (+ α)*
15	35 (0)	7.5 (0)	300 (0)
16	35 (0)	7.5 (0)	300 (0)
17	35 (0)	7.5 (0)	300 (0)

* Puntos axiales imprescindibles para la condición de rotabilidad

2.2.2 Reacción de transesterificación. Todas las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo en matraces de 25 ml con tapón, en los cuales se agregaron 2 g de ARP, agua destilada (1 %p/p) y metanol en una relación molar con el ARP de 3:1 (Tacias-Pascacio et al., 2017). La temperatura, cantidad de biocatalizador y agitación se fijaron de acuerdo a lo indicado en el diseño experimental (tabla 3). Los matraces fueron colocados en un Shaker Incubadora New Brunswick Scientific modelo Excella E24 durante 24 horas. Al finalizar la reacción, la mezcla resultante se centrifugó en una Centrífuga Labnet Z306 A a 4000 rpm durante 15 minutos. Se tomó la fase superior, la cual contenía los esteres, y se analizó de acuerdo con la norma europea UNE-EN 14103 en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 5975C para determinar el contenido de FAMES (**Ver anexo D**).

2.2.3 Análisis estadístico. Mediante un análisis de regresión lineal múltiple, los valores de la variable de respuesta se ajustaron a un polinomio de segundo orden como el descrito por la ecuación 2 y se evaluó la significancia estadística del modelo y de los efectos lineales, de curvatura y de interacción entre factores mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando la versión gratuita del software Statgraphics Centurion XV.II. Se evaluó la bondad del ajuste a través del coeficiente R^2 (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2012). Se generaron las superficies de respuesta respectivas utilizando la ecuación del modelo ajustado, manteniendo uno de los factores en el nivel medio y variando los otros dos factores entre sus niveles inferior y superior. Se hizo un experimento confirmatorio utilizando una combinación de factores que no hacía parte del DCC original, pero que se encontraba dentro del dominio experimental (punto de validación), más exactamente, dentro de los rangos más favorables para la producción de biodiésel. El experimento se hizo por triplicado.

2.2.4 Caracterización del biodiésel. El biodiésel obtenido para el punto de validación se caracterizó mediante la determinación de las propiedades descritas en la tabla 4; también se determinó el contenido de FAMES de esa muestra. Los análisis se realizaron por duplicado.

Tabla 4.

Descripción de propiedades para la caracterización del biodiésel obtenido para el punto de validación.

Propiedad	Descripción
Densidad	UNE-EN ISO 3675; se determinó a 15°C
Viscosidad	UNE-EN ISO 3104; se utilizó un viscosímetro Anton Paar's Stabinger Viscometer™ SVM 3000.
Índice de acidez	UNE-EN 14104
Estabilidad oxidativa	UNE-EN 14112; se utilizó un 873 Biodiésel Rancimat
Punto de nube	ASTM D2500.
Poder calorífico	ASTM D240, en una bomba calorimétrica P.A. Hilton Ltd C200.
Humedad	UNE-EN ISO 12937; se utilizó un titulador coulométrico HI903 Karl Fischer

Adicionalmente, se llevó a cabo un experimento para el punto de validación con el fin de evaluar la variación en el contenido de FAMES durante la transesterificación. El experimento, que se hizo siguiendo lo descrito en la sección 2.2.2, consistió en tomar muestras de la mezcla reaccionante al cabo de 2, 4, 6, 12 y 24 horas de reacción y analizarlas de acuerdo con la norma UNE-EN 14103. Cada análisis se hizo por duplicado.

3. Resultados y Análisis

3.1 Caracterización de la materia prima

El ARP se obtuvo con un rendimiento de 74,63%. Los ácidos grasos de mayor proporción en el aceite fueron el ácido oleico (25,39 %p/p), ácido palmítico (25,36 %p/p), ácido esteárico (8,57 %p/p) y ácido linoleico (6,58 %p/p) (tabla 5). Comparado con otros aceites de pescado cuyo contenido de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) es alto (>20% en peso), esta materia prima contiene un bajo porcentaje de EPA y DHA, y por tanto puede ser más rentable su uso como materia prima en la producción de biocombustibles (El-Mashad, 2008; Uauy & Valenzuela, 2009; Ward & Singh, 2005)

Tabla 5.

Perfil de ácidos grasos del aceite de residuos de pescado

Nombre común del ácido graso	Abreviatura	Porcentaje (%p/p)
Ácido mirístico	C14:0	3,98
Ácido pentadecílico	C15:0	2,57
Ácido palmítico	C16:0	25,36
Ácido palmitoleico	C16:1n-7	8,18
Ácido margárico	C17:0	1,66
Ácido esteárico	C18:0	8,57
Ácido oleico	C18:1n-9	25,39
Ácido linoleico	C18:2n-6	6,58

Nombre común del ácido graso	Abreviatura	Porcentaje (%p/p)
Ácido alfa-linolénico	C18:3n-3	1,73
Ácido araquidónico	C20:4n-6	1,99
Ácido eicosapentaenoico, EPA	C20:5n-3	2,13
Ácido adrenico	C22:4n-6	2,60
Ácido docosahexaenoico, DHA	C22:6n-3	5,45
Otros (<1%)*		3,81
Ácidos grasos Saturados		42,14
Ácidos grasos Monoinsaturados		37,38
Ácidos grasos Poliinsaturados		20,48

* Suma total de otros ácidos grasos que están presentes en menos de 1% en peso.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la caracterización del ARP. Los valores de la densidad, la viscosidad y el índice de saponificación son similares a los reportados por otros autores que trabajaron con aceite de residuos de pescado de otras especies (Costa, Almeida, Alvim-Ferraz, & Dias, 2013; Menegazzo et al., 2015; Serrano et al., 2015). El índice de acidez difiere un poco del indicado por Menegazzo *et al.* (Menegazzo et al., 2015) y Costa *et al.* (Costa et al., 2013), lo cual puede atribuirse a diferencias en el tipo de pescado, en el proceso de extracción de los ARPs o en el almacenamiento que éstos han tenido después de ser recolectados. Este valor es superior a 1 mg KOH/g (Banerjee & Chakraborty, 2009); sin embargo, no se requiere un pretratamiento del ARP ya que la catálisis enzimática no forma jabones (Calle, Coello, & Castro, 2019). La humedad no presenta un valor alto, como se encontró en estudios previos (G. Ma et al., 2018; Wiggers, Wisniewski, Madureira, Barros, & Meier, 2009).

Tabla 6.

Propiedades del aceite de residuos de pescado

PROPIEDAD	Presente trabajo	(Meneg azzo et al., 2015)	(Meneg azzo et al., 2015)	(Cost a et al., 2013)	(Serra no et al., 2015)
		Nile tilapia	hybrid Sorubim		Salmon
Densidad (g/ml)	0,920±0,001	0,927	0,935	-	0,910
Viscosidad (mm ² /s) (40°C)	31,76±0,01	-	-	-	33,61
Índice de acidez (mg KOH/g aceite)	3,17±0,04	0,412	0,306	10,04	-
Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	197,76±1,99	194,99	212,29	-	-
Humedad (%p/p)	0,08±0,01	0,02	0,016	0,28	-
Peso molecular (g/mol)	849, 55	-	-	882,6 0	-

3.2 Obtención de biodiésel

3.2.1 Reacción de transesterificación. Los resultados de las corridas del DCC se muestran en la tabla 7. Se puede observar que el contenido de FAMES oscila entre 11,93 y 75,99 %p/p. Estos valores están por debajo del valor mínimo que especifica la norma UNE-EN 14103, el cual es de 96,5%; sin embargo, el máximo valor alcanzado es similar al obtenido por Tacias *et al.* (Tacias-Pascacio et al., 2017). Este valor se debe a la especificidad 1,3 de la lipasa TLL (Fernandez-Lafuente, 2010; Tacias-Pascacio et al., 2017).

Tabla 7.

Contenido de FAMES para el diseño central compuesto

Experimento	X1	X2	X3	Contenido de FAME (%p/p)
1	30 (-1)	5 (-1)	250 (-1)	72,25±1,78
2	40 (+1)	5 (-1)	250 (-1)	19,93±1,24
3	30 (-1)	10 (+)	250 (-1)	75,76±1,77
4	40 (+1)	10 (+)	250 (-1)	73,99±1,06
5	30 (-1)	5 (-1)	350 (+1)	69,52±2,86
6	40 (+1)	5 (-1)	350 (+1)	15,51±0,05
7	30 (-1)	10 (+)	350 (+1)	75,99±1,63
8	40 (+1)	10 (+)	350 (+1)	23,75±2,16
9	27 (- α)*	7,5 (0)	300 (0)	60,74±0,22
10	43 (+ α)*	7,5 (0)	300 (0)	11,93±2,90
11	35 (0)	3 (- α)*	300 (0)	21,54±1,54
12	35 (0)	12 (+ α)*	300 (0)	49,02±0,21
13	35 (0)	7.5 (0)	216 (- α)*	65,66±3,24
14	35 (0)	7.5 (0)	384 (+ α)*	29,46±0,77
15	35 (0)	7.5 (0)	300 (0)	65,43±1,35
16	35 (0)	7.5 (0)	300 (0)	69,84±1,45
17	35 (0)	7.5 (0)	300 (0)	71,18±2,01

3.2.2 Análisis estadístico. En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis de varianza.

Se evidencia que el único efecto no significativo fue la interacción cuadrática (CC) para el tercer factor (X3). Los demás efectos fueron significativos, es decir, su valor- p fue inferior a $<0,05$ con un nivel de confianza del 95,0%. Esto se muestra de manera gráfica mediante el diagrama de Pareto (Figura 2)

Tabla 8.

Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño central compuesto

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F	Valor-p
Modelo	16920,6	9	1880,06	18,14	0,0000
A:X1	8616,23	1	8616,23	79,69	0,0000
B:X2	2051,14	1	2051,14	18,97	0,0002
C:X3	2046,02	1	2046,02	18,92	0,0002
AA	1469,53	1	1469,53	13,59	0,0012
AB	680,688	1	680,688	6,3	0,0196
AC	683,561	1	683,561	6,32	0,0194
BB	1608,45	1	1608,45	14,88	0,0008
BC	462,895	1	462,895	4,28	0,0500
CC	379,856	1	379,856	3,51	0,0736
blocks	0,762003	1	0,762003	0,01	0,9338
Error total	2486,91	23	108,126		
Total corregido	19408,3	33			

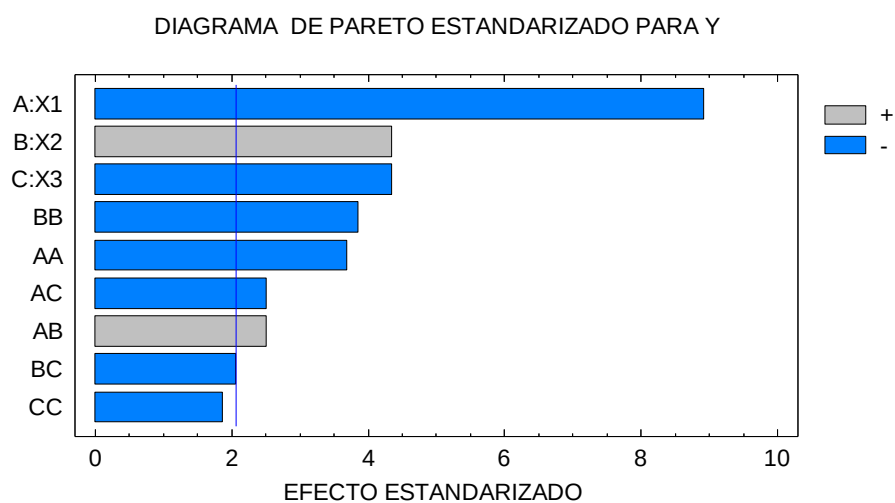
 $R^2 = 87,19\%$ $R^2_{ajustado} = 82,38\%$


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para el contenido de FAME

3.2.2.1 Efecto de los factores sobre el contenido de FAMEs. La temperatura (X1) es el factor más significativo y tiene un efecto negativo sobre la variable de respuesta (Figura 3), es decir, al aumentar la temperatura, el contenido de FAMEs disminuye. Esto puede deberse a que valores altos de la temperatura pueden inactivar la enzima (Rodrigues et al., 2009). La velocidad de agitación (X3) tiene el mismo efecto negativo y puede deberse al daño mecánico ocasionado a la enzima por las altas velocidades de agitación (Robles-Medina et al., 2009). En cambio, la concentración de biocatalizador (X2) tiene un efecto positivo, o sea, al aumentar la cantidad de biocatalizador, el contenido de FAMEs aumenta.

Estos efectos, sin embargo, dependen del nivel en que se encuentren los otros factores. Cuando la temperatura se incrementa, la disminución en el contenido de FAMEs es menor si la concentración de catalizador está en su nivel superior. Esto evidencia que el impacto ocasionado sobre la lipasa cuando se trabaja en condiciones cercanas a su temperatura de desnaturalización es atenuado por un incremento en la concentración de biocatalizador: una mayor cantidad de biocatalizador permite tener más sitios activos disponibles para la reacción (Fernandez-Lafuente, 2010; Nie, Xie, Wang, & Tan, 2006).

Lo mismo sucede si la velocidad de agitación está en su nivel inferior: el impacto sobre la producción de FAMEs al incrementarse la temperatura es menor. Esto es consecuencia de la mayor interacción entre la enzima y el ARP a bajas velocidades que mejora la transferencia de masa entre ellas (Palomino, Bocanegra, López, & Flórez, 2011). Por consiguiente, es de esperarse que las condiciones más favorables para el proceso correspondan a temperaturas y velocidades de agitación bajas y concentraciones de biocatalizador altas.

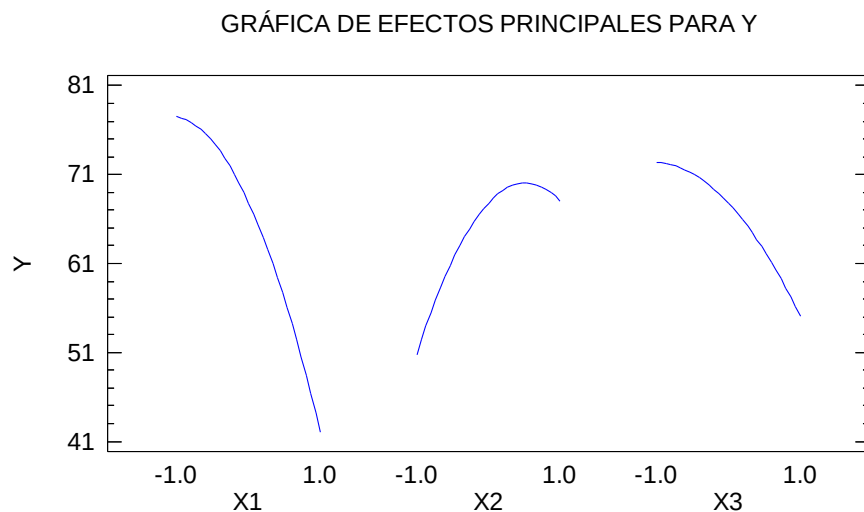


Figura 3. Diagrama de efectos principales para Y

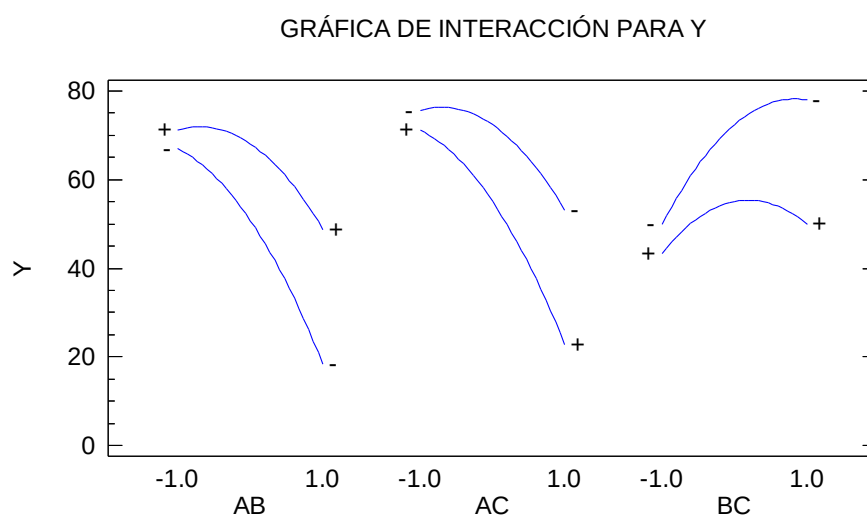


Figura 4. Diagrama de interacciones para Y.

Se ajustaron los datos de la tabla 8 a un modelo polinomial de segundo orden por medio de una ecuación de regresión. La ecuación del modelo ajustado es:

$$Y = 67,82 - 17,76(X_1) + 8,67(X_2) - 8,65(X_3) - 8,07(X_1)^2 - 8,45(X_2)^2 - 4,10(X_3)^2 + 6,52(X_1)(X_2) - 6,54(X_1)(X_3) - 5,38(X_2)(X_3) \quad (3)$$

El modelo resultó estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%. El coeficiente de determinación (R^2) arrojó un valor de 87,19%, lo cual indica que el modelo explica este porcentaje de la variabilidad en el contenido de FAMES. Debido a que este valor fue menor que 90%, se buscó determinar si el modelo se podía simplificar mediante una “selección hacia atrás”. Se observó que el valor- p más alto correspondía a C^2 (valor- $p = 0,0676$). Dado que este valor es mayor que 0,05, el factor no era estadísticamente significativo, y se procedió a suprimirlo del modelo y verificar si se conseguía un mejor ajuste. Contrariamente a lo que se esperaba, el R^2 disminuyó posiblemente por un aumento en el error estándar de la estimación (tabla 9). En consecuencia, se probó suprimir también el factor BC, el cual se encontraba en el límite de significancia (valor- $p = 0,0500$). Esto tampoco mejoró el ajuste, y se decidió entonces continuar con el modelo original.

Tabla 9.

Determinación del modelo Y, Selección hacia atrás

Regresión	Términos excluidos	Valor- p	R^2	R-ajustado	error estándar de la estimación
1	Ninguno	0,0000	87,19	82,38	10,40
2	C^2	0,0000	85,23	80,50	10,71
3	C^2 y BC	0,0000	82,84	78,22	11,32

A partir del modelo ajustado, se generaron las superficies de respuesta correspondientes, las cuales confirman lo expuesto anteriormente: que la producción de FAMES se favorece a bajas temperaturas y se incrementa al aumentar la concentración de biocatalizador y disminuir la velocidad de agitación, que el contenido de FAMES disminuye menos al incrementarse la

temperatura a concentración de biocatalizador altas y velocidades de agitación bajas (Figura 5, 6 y 7).

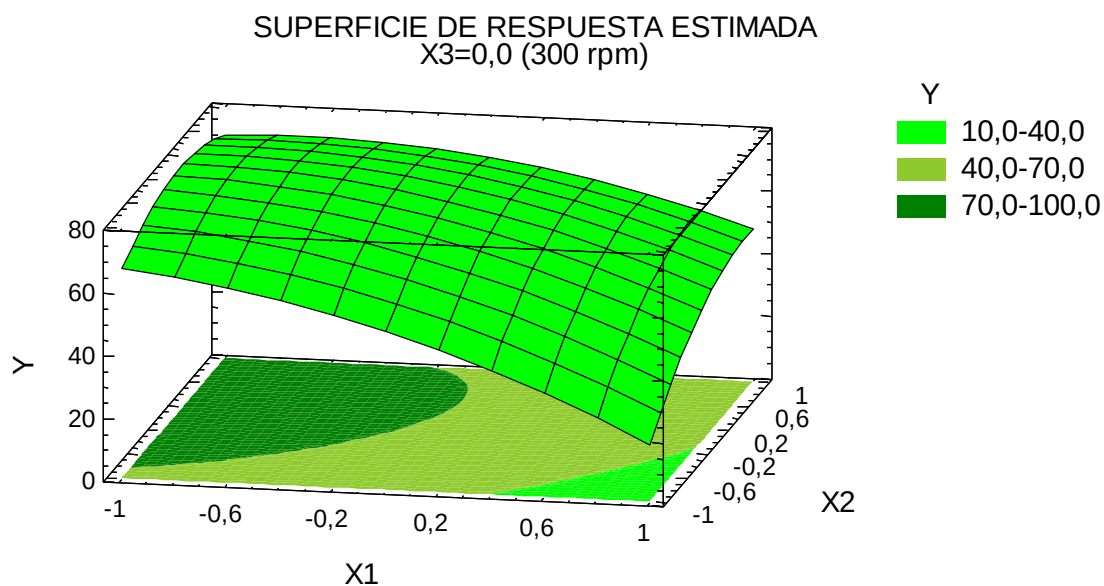


Figura 5. Superficie de respuesta estimada X1 – X2 Vs contenido de FAMES

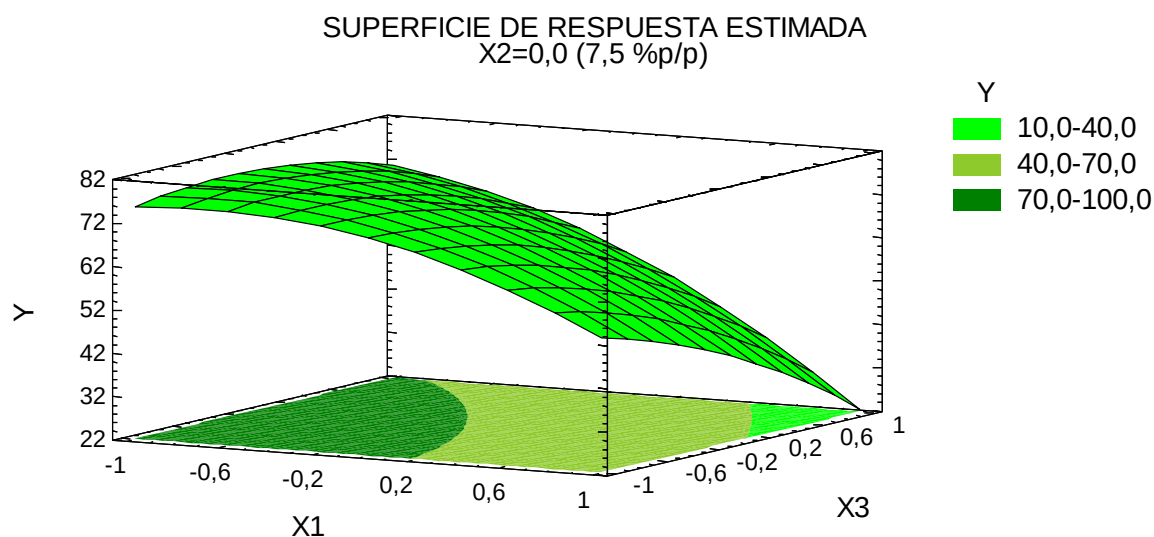


Figura 6. Superficie de respuesta estimada X1 – X3 Vs Contenido de FAMES

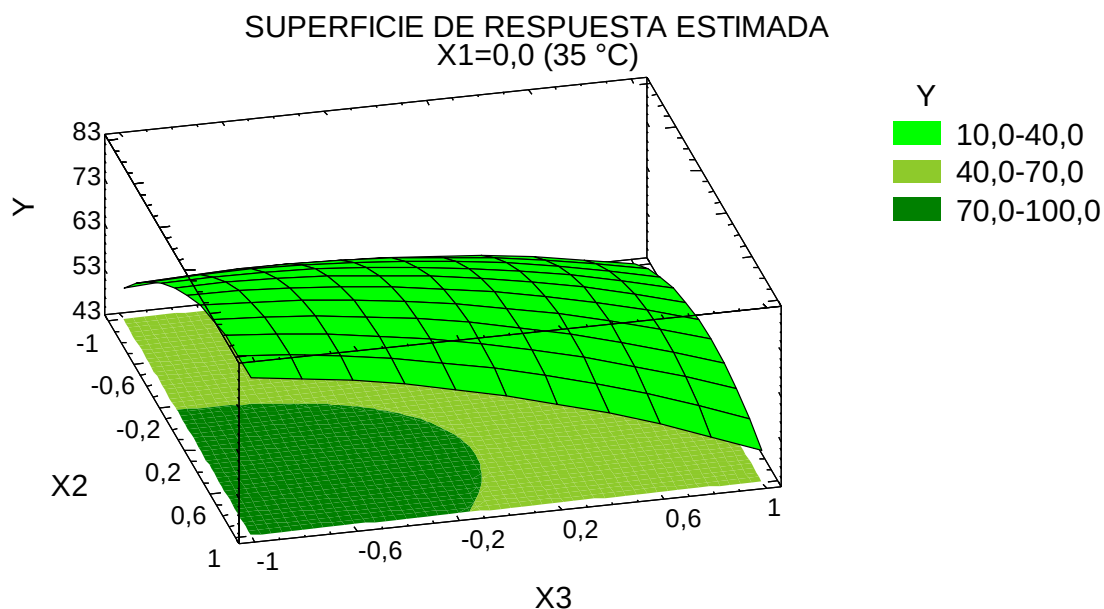


Figura 7. Superficie de respuesta estimada X2 – X3 Vs contenido de FAMEs

Asimismo, las superficies de respuesta permiten establecer los rangos más favorables para la producción de FAMEs (> 70%). Manteniendo la velocidad de agitación en el punto central, se puede observar que la región donde se predice que el contenido de FAMEs es mayor que 70% se extiende desde 30 (-1) hasta 35°C (0) para una concentración de biocatalizador de 8,8 %p/p. Esto comprueba que es posible usar una concentración menor que 10 %p/p sin afectar el rendimiento de la reacción. Se podría emplear una concentración todavía menor, pero la temperatura máxima no podría ser 35 °C; tendría que ser menor. Lo anterior es consistente con lo observado si se mantiene X2 en su punto central: cualquier combinación de temperatura > 36 °C y 250 rpm desfavorece la reacción, y conforme aumenta la velocidad de agitación, la temperatura máxima permisible disminuye.

En el caso de la temperatura en su punto central, el rango más favorable corresponde a concentraciones de biocatalizador > 7 %p/p y velocidades de agitación < 300 rpm. Estos límites se tuvieron en cuenta al escoger los niveles de los factores para la validación del modelo.

3.3 Validación del modelo para el contenido de fames del biodiésel

En la tabla 10, se reportan los resultados para la validación del modelo. Los niveles de los factores que se escogieron fueron el valor central de la temperatura ($X_1=0$), el nivel superior de la concentración de biocatalizador ($X_2=+1$) y el punto axial negativo de la velocidad de agitación ($X_3=-\alpha$). El promedio de los valores reales (72,56 %p/p) es superior a 70%p/p. El promedio de las desviaciones entre el valor predicho por el modelo y el promedio de los valores reales resultó ser inferior al 10%. Esto confirma que el modelo predice apropiadamente el contenido de FAMES dentro del dominio experimental, con una exactitud razonable.

Tabla 10.

Experimentos de confirmación para validar la predicción del modelo de regresión para el contenido de FAMES del biodiésel de aceite de residuos de pescado.

Corrida	Punto de validación			Contenido de FAMES			
	X1	X2	X3	Real	Predicho	Desviación (%)	Promedio de la desviación (%)
1	35 (0)	10 (+1)	216 (- α)	72,45	80,04	9,48	9,34
2	35 (0)	10 (+1)	216 (- α)	72,73	80,04	9,13	
3	35 (0)	10 (+1)	216 (- α)	72,51	80,04	9,40	

3.4 Caracterización del biodiésel

Las propiedades del biodiésel de ARP (BARP) se muestran en la tabla 11. Estos resultados se compararon con los obtenidos a partir de aceite de pescado de otras especies mediante transesterificación por catálisis básica y ácida, debido a la limitada información relacionada con la catálisis enzimática. El valor de la densidad es muy cercano al reportado por Serrano *et al.* (Serrano

et al., 2015) y Kara *et al.* (Kara et al., 2018) y se encuentra dentro de las especificaciones de la Norma UNE-EN 14214. La viscosidad cinemática está por encima de los valores de Serrano *et al.* (Serrano et al., 2015) y Kara *et al.* (Kara et al., 2018) y del valor especificado en la Norma UNE-EN 14214, pero es inferior a la obtenida en el estudio de García-Moreno *et al.* (García-Moreno et al., 2014) y se encuentra dentro de las especificaciones de la Norma ASTM D6751 (**Anexo F**). Esto pudo deberse a la mayor presencia de AGL en el BARP, los cuales no sólo incrementan el índice de acidez, como se observa en la tabla, sino que también incrementan la viscosidad (Knothe & Steidley, 2009).

La estabilidad oxidativa es tan baja como la reportada por Costa *et al.* (Costa et al., 2013) y puede asociarse al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) del biodiésel (20.48%p/p). Los PUFAs son altamente susceptibles a la oxidación (Knothe, Krahel, & Van Gerpen, 2010) y por eso se tendría que plantear la posibilidad de utilizar antioxidantes o preparar mezclas de BARP y biodiésel de mayor resistencia a la oxidación, como el de aceite de palma (Plata, Haagensohn, et al., 2015).

Tabla 11.

Propiedades del biodiésel de residuos de pescado

	Catálisis enzimática	Catálisis ácida	Catálisis básica	Norma UNE-EN 14214
PROPIEDAD	Presente estudio	(Serrano et al., 2015)	(Kara et al., 2018)	Anexo E
Contenido de FAME	72,56%±0,15	-	95,1	96,5 Min
Densidad (g/ml)	0,89±0,01	0,891	0,883	860-900
Viscosidad (mm ² /s) (40°C)	5,32±0,004	4,55	3,95	3,50-5,00

	Catálisis enzimática	Catálisis ácida	Catálisis básica	Norma UNE-EN 14214
PROPIEDAD	Presente estudio	(Serrano et al., 2015)	(Kara et al., 2018)	Anexo E
Índice de acidez (mg KOH/g aceite)	0,93±0,28	-	0,16	0,50 Max.
Estabilidad oxidativa (horas)	0,09±0,01	0,95	-	6 Min.
Punto de nube (°C)	10,51±0,47	6	-	-
Poder calorífico (MJ/kg)	38,13±0,21	-	-	-
Humedad (mg/Kg)	1675±25	-	1413	500 Max.

El punto de nube es mucho mayor en comparación con el que obtuvieron Serrano *et al.* (Serrano et al., 2015) y puede atribuirse al alto contenido de ácidos grasos saturados del biodiésel (42,14 %p/p). Sin embargo, se han reportado valores de hasta 16 °C (Arumugam & Ponnusami, 2017), planteando la necesidad adicional de mezclar el BARP con biodiésel con un punto de nube bajo.

El BARP presentó un poder calorífico menor que el diésel (44,80 MJ/kg) (Senthilkumar, Sivakumar, & Manoharan, 2015). Swaminathan y Sarangan (Swaminathan & Sarangan, 2012) y Gislaine *et al.* (G. I. Martins et al., 2015) reportaron valores similares a los obtenidos en el presente estudio. Estos valores muestran que el biodiésel de aceite de pescado posee una menor capacidad de combustión en comparación con el diésel (Silitonga et al., 2013; Silva & Oliveira, 2013). No obstante, cumple el requerimiento establecido en la Norma UNE-EN 14213 para combustibles para calefacción (35 MJ/ kg).

El contenido de humedad es más de tres veces mayor que el límite establecido en la Norma UNE-EN 14214 y esto se debe a la adición de agua al inicio de la reacción necesaria para favorecer la interacción entre el biocatalizador y el ARP (Fregolente et al., 2008). Este valor, sin embargo, es similar al reportado por otros autores (Kara et al., 2018), y puede reducirse mediante secado.

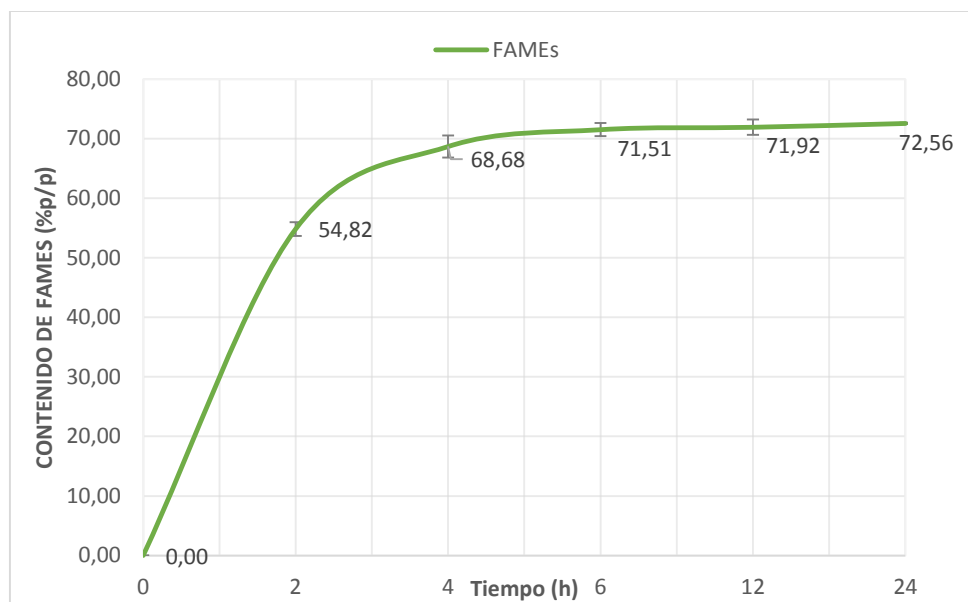


Figura 8. Cinética de reacción de la producción de biodiésel

La producción de FAMES aumenta significativamente durante las primeras 4 h y supera el 70%p/p al cabo de 6 h, después de lo cual el incremento es de apenas 1%. Se establece entonces que la reacción se completa después de 6 h y por tanto no es necesario prolongarla hasta las 24 h.

4. Conclusiones

El aceite de residuos de pescado se obtuvo a partir de vísceras de pescado de las especies Robalo prieto, Chopa, Peto y Mojarra rayada con un rendimiento del 74,63 %p/p, el cual poseía un contenido de ácidos grasos saturados de 42,14 %p/p, monoinsaturados de 37,38 %p/p y PUFAs del 20,48 %p/p. La densidad (0,92 g/ml), viscosidad (31,76 mm²/s) e índice de saponificación (197,76 mg KOH/g aceite) del aceite, fueron similares a los reportados por otros autores.

La transesterificación enzimática de ARP y metanol utilizando la lipasa inmovilizada TLL en Metacrilato de Octadecilo permitió producir biodiésel con un contenido de FAMES mayor al 70% empleando condiciones bajas de temperatura y velocidad de agitación y contenidos altos de biocatalizador, dentro de los valores estudiados.

La temperatura fue el factor más significativo y tuvo un efecto negativo sobre la variable de respuesta; esto pudo deberse a que altos valores de la temperatura pueden inactivar la enzima.

La región donde se encontró que el contenido de FAMES es mayor que 70% se extiende desde 30 hasta 35 °C para una concentración de biocatalizador de 8,8 %p/p y 300 rpm. Podría emplearse una concentración menor, pero la temperatura tendría que ser menor a 35 °C.

La densidad del BARP cumple las Normas UNE-EN 14214 y ASTM D6751-09 y únicamente la viscosidad se ajustó a los estándares de la norma americana. El poder calorífico fue menor que el del diésel; no obstante, cumplió con el requerimiento establecido en la Norma UNE-EN 14213 para combustibles para calefacción (35 MJ/ kg). Sin embargo, presenta un contenido de humedad

más de tres veces mayor que el límite establecido en la Norma UNE-EN 14214, pero puede reducirse mediante secado.

El ARP presentó un alto contenido ácidos grasos saturados y de PUFAs, a diferencia de la mayoría de aceites. Esto ocasionó que la estabilidad oxidativa fuera muy baja y que el punto de nube fuera relativamente alto, planteando la necesidad de utilizar el BARP en mezclas con otro tipo de biodiésel.

5. Recomendaciones

Realizar un análisis económico con el fin de evaluar la factibilidad de la utilización de ARP como materia prima para la producción de biodiésel a escala industrial.

Evaluar el efecto del mezclado de BARP con otro biodiésel sobre las propiedades del biodiésel resultante, con el fin de obtener mejores resultados que se ajusten a los estándares internacionales.

Comprobar la estabilidad enzimática de la lipasa con esta materia prima después de varios ciclos de reuso.

Referencias Bibliográficas

- Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M. R., & Najafi, G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, 63, 138-148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.02.027>
- Adewale, P., Dumont, M.-J., & Ngadi, M. (2015). Recent trends of biodiesel production from animal fat wastes and associated production techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 574-588. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.039>
- Agueiras, E. C. G., de Barros, D. S. N., Sousa, H., Fernandez-Lafuente, R., & Freire, D. M. G. (2017). Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. *Renewable Energy*, 113, 112-118. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.05.090>
- Ali, M. H., Mashud, M., Rubel, M. R., & Ahmad, R. H. (2013). Biodiesel from Neem Oil as an Alternative Fuel for Diesel Engine. *Procedia Engineering*, 56, 625-630. doi:<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.03.169>
- Arumugam, A., & Ponnusami, V. (2017). Production of biodiesel by enzymatic transesterification of waste sardine oil and evaluation of its engine performance. *Heliyon*, 3(12), e00486. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00486>
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., & Aziz, A. A. (2010). High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 1999-2008. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.020>
- Azócar, L., Navia, R., Beroiz, L., Jeison, D., & Ciudad, G. (2014). Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. *New Biotechnology*, 31(5), 422-429. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.04.006>

- Banerjee, A., & Chakraborty, R. (2009). Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 53(9), 490-497. doi:<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2009.04.003>
- Banković-Ilić, I. B., Stojković, I. J., Stamenković, O. S., Veljkovic, V. B., & Hung, Y.-T. (2014). Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 238-254. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.038>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 33(5), 435-456. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3), 124-132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.008>
- Bocanegra Claudia, C., Marina Flórez, L., Enrique López, J., & Palomino, A. (2011). *Biodiesel a partir de aceite de higuera utilizando lipasa inmovilizada* (Vol. 12).
- Calle, J., Coello, J., & Castro, P. (2019). *OPCIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL EN EL PERÚ*.
- Canesin, E. A., de Oliveira, C. C., Matsushita, M., Dias, L. F., Pedrão, M. R., & de Souza, N. E. (2014). Characterization of residual oils for biodiesel production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1), 39-45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.007>
- Canet, A., Dolors Benaiges, M., & Valero, F. (2014). Biodiesel Synthesis in a Solvent-Free System by Recombinant *Rhizopus oryzae* Lipase. Study of the Catalytic Reaction Progress. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(9), 1499-1506. doi:10.1007/s11746-014-2498-y
- Cerveró, J. M., Coca, J., & Luque, S. (2008). Production of biodiesel from vegetable oils. *Grasas y Aceites; Vol 59, No 1 (2008)* DO - 10.3989/gya.2008.v59.i1.494.

- Chakraborty, R., Gupta, A. K., & Chowdhury, R. (2014). Conversion of slaughterhouse and poultry farm animal fats and wastes to biodiesel: Parametric sensitivity and fuel quality assessment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29, 120-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.082>
- Charpe, T. W., & Rathod, V. K. (2011). Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Management*, 31(1), 85-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.09.003>
- Costa, J. F., Almeida, M. F., Alvim-Ferraz, M. C. M., & Dias, J. M. (2013). Biodiesel production using oil from fish canning industry wastes. *Energy Conversion and Management*, 74, 17-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.04.032>
- da Cunha, M. E., Krause, L. C., Moraes, M. S. A., Faccini, C. S., Jacques, R. A., Almeida, S. R., . . . Caramão, E. B. (2009). Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. *Fuel Processing Technology*, 90(4), 570-575. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.01.001>
- Dias, J. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Almeida, M. F., Méndez Díaz, J. D., Sánchez Polo, M., & Rivera Utrilla, J. (2013). Biodiesel production using calcium manganese oxide as catalyst and different raw materials. *Energy Conversion and Management*, 65, 647-653. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.09.016>
- Ehsan, M., & Chowdhury, M. T. H. (2015). Production of Biodiesel Using Alkaline Based Catalysts From Waste Cooking Oil: A Case Study. *Procedia Engineering*, 105, 638-645. doi:<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.042>
- El-Mashad, H. M. (2008). A two-step process for biodiesel production from salmon oil. *Biosystems engineering*, v. 99(no. 2), pp. 220-220-2008 v.2099 no.2002.
- Enweremadu, C. C., & Mbarawa, M. M. (2009). Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2205-2224. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.06.007>
- Fadhil, A. B., Al-Tikrity, E. T. B., & Albadree, M. A. (2017). Biodiesel production from mixed non-edible oils, castor seed oil and waste fish oil. *Fuel*, 210, 721-728. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.09.009>

- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos del desarrollo sostenible. In (CC BY-NC-SA 3.0 IGO ed.). Roma.
- Farooq, M., Ramli, A., & Naeem, A. (2015). Biodiesel production from low FFA waste cooking oil using heterogeneous catalyst derived from chicken bones. *Renewable Energy*, 76, 362-368. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.11.042>
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(3), 197-212. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>
- Fiori, L., Volpe, M., Lucian, M., Anesi, A., Manfrini, M., & Guella, G. (2017). From Fish Waste to Omega-3 Concentrates in a Biorefinery Concept. *Waste and Biomass Valorization*, 8(8), 2609-2620. doi:10.1007/s12649-017-9893-1
- Fjerbaek Søtof, L., Christensen, K., & Norddahl, B. (2009). *A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification* (Vol. 102).
- Fregolente, P. B. L., Fregolente, L. V., Pinto, G. M. F., Batistella, B. C., Wolf-Maciel, M. R., & Filho, R. M. (2008). Monoglycerides and Diglycerides Synthesis in a Solvent-Free System by Lipase-Catalyzed Glycerolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146(1), 165-172. doi:10.1007/s12010-008-8133-3
- FT, S., LEC, B., & ML, P. (2003). Proposta de aproveitamento dos resíduos das indústrias de beneficiamento de pescado de Santa Catarina com base num sistema gerencial de bolsa de resíduos. In (Responsabilidade social de las empresas: la contribución de las universidades ed., pp. 373–406). São Paulo: Garcia BG.
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416. doi:[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7)
- García-Moreno, P. J., Khanum, M., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2014). Optimization of biodiesel production from waste fish oil. *Renewable Energy*, 68, 618-624. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.014>

- Gharehghani, A., Mirsalim, M., & Hosseini, R. (2017). Effects of waste fish oil biodiesel on diesel engine combustion characteristics and emission. *Renewable Energy*, 101, 930-936. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.09.045>
- Guldhe, A., Singh, B., Mutanda, T., Permaul, K., & Bux, F. (2015). Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1447-1464. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.035>
- Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (M.-H. Interamericana Ed. Segunda edición ed.). Mexico, D.F.
- Hameed, B. H., Lai, L. F., & Chin, L. H. (2009). Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. *Fuel Processing Technology*, 90(4), 606-610. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2008.12.014>
- Hong, I. K., Park, J. W., & Lee, S. B. (2013). Optimization of fish-oil-based biodiesel synthesis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(3), 764-768. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.10.011>
- Huong, L. T. T., Tan, P. M., & Hoa, T. T. V. (2011). Biodiesel Production from Fat of Tra Catfish via Heterogeneous Basic-Catalyzed Transesterification Using Ultrasonic Mixing. *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, 9, 477-481. doi:10.1380/ejsnt.2011.477
- Iastiaque Martins, G., Secco, D., Kazue Tokura, L., Aparecido Bariccatti, R., Dresch Dolci, B., & Ferreira Santos, R. (2015). Potential of tilapia oil and waste in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 234-239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.020>
- Jayasinghe, P., & Hawboldt, K. (2012). A review of bio-oils from waste biomass: Focus on fish processing waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 798-821. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.005>
- Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., & Ravindra, P. (2008). Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(4), 253-264. doi:10.1080/07388550802428392

- Kara, K., Ouanji, F., Lotfi, E. M., Mahi, M. E., Kacimi, M., & Ziyad, M. (2018). Biodiesel production from waste fish oil with high free fatty acid content from Moroccan fish-processing industries. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27(2), 249-255. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2017.07.010>
- Knothe, G., Krahle, J., & Van Gerpen, J. (2010). Fuel Properties. In *The Biodiesel Handbook (Second Edition)* (pp. 137-251): AOCS Press.
- Knothe, G., & Steidley, K. R. (2009). A comparison of used cooking oils: A very heterogeneous feedstock for biodiesel. *Bioresource Technology*, 100(23), 5796-5801. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.064>
- Li, X., He, X.-Y., Li, Z.-L., Wang, Y.-D., Wang, C.-Y., Shi, H., & Wang, F. (2012). Enzymatic production of biodiesel from Pistacia chinensis bge seed oil using immobilized lipase. *Fuel*, 92(1), 89-93. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.048>
- Lima, L. N., Oliveira, G. C., Rojas, M. J., Castro, H. F., Da Rós, P. C. M., Mendes, A. A., . . . Tardioli, P. W. (2015). Immobilization of Pseudomonas fluorescens lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(4), 523-535. doi:[10.1007/s10295-015-1586-9](https://doi.org/10.1007/s10295-015-1586-9)
- Lin, C.-Y., & Li, R.-J. (2009a). Engine performance and emission characteristics of marine fish-oil biodiesel produced from the discarded parts of marine fish. *Fuel Processing Technology*, 90(7), 883-888. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.04.009>
- Lin, C.-Y., & Li, R.-J. (2009b). Fuel properties of biodiesel produced from the crude fish oil from the soapstock of marine fish. *Fuel Processing Technology*, 90(1), 130-136. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2008.08.002>
- Liu, C.-H., Huang, C.-C., Wang, Y.-W., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2012). Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by Burkholderia lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, 100, 41-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.053>
- Lozano, P., Bernal, J. M., Sánchez-Gómez, G., López-López, G., & Vaultier, M. (2013). How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Energy & Environmental Science*, 6(4), 1328-1338. doi:[10.1039/C3EE24429F](https://doi.org/10.1039/C3EE24429F)

- Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review¹Journal Series #12109, Agricultural Research Division, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska–Lincoln.1. *Bioresource Technology*, 70(1), 1-15. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5)
- Ma, G., Dai, L., Liu, D., & Du, W. (2018). Lipase-Mediated Selective Methanolysis of Fish Oil for Biodiesel Production and Polyunsaturated Fatty Acid Enrichment. *Energy & Fuels*, 32(7), 7630-7635. doi:10.1021/acs.energyfuels.8b00749
- Mahesh, S. E., Ramanathan, A., Begum, K. M. M. S., & Narayanan, A. (2015). Biodiesel production from waste cooking oil using KBr impregnated CaO as catalyst. *Energy Conversion and Management*, 91, 442-450. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.12.031>
- Martins, A. B., Friedrich, J. L. R., Cavaleiro, J. C., Garcia-Galan, C., Barbosa, O., Ayub, M. A. Z., . . . Rodrigues, R. C. (2013). Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. *Bioresource Technology*, 134, 417-422. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.052>
- Martins, G. I., Secco, D., Rosa, H. A., Bariccatti, R. A., Dolci, B. D., Melegari de Souza, S. N., . . . Gurgacz, F. (2015). Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 154-157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.024>
- Marín-Suárez, M., Méndez-Mateos, D., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2019). Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel. *Renewable Energy*, 140, 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.035>
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), 248-268. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>
- Menegazzo, M. L., Franco Lucas, B., Boarin Alcade, L., Petenucci, M. E., & Graciano Fonseca, G. (2015). Production of biodiesel via methyl and ethyl routes from Nile tilapia and hybrid Sorubim crude oils. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 150-154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.011>

- Montgomery, D. C. (2006). *Diseño y Análisis de Experimentos* (L. NORIEGA Ed. 2 ed.): LIMUSA WILEY.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., & Tan, T. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1), 142-147. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.07.016>
- Palomino, A., Bocanegra, C. C., López, J. E., & Flórez, I. M. (2011). Biodiesel a partir de aceite de higuera utilizando lipasa inmovilizada. *Ingeniería y Competitividad* 12, 9-18.
- Patel, R. L., & Sankhavar, C. D. (2017). Biodiesel production from Karanja oil and its use in diesel engine: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 464-474. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.075>
- Perea, A. (2007). Obtención de biodiésel por transesterificación de aceite de palmiste utilizando lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. In (Vol. 2).
- Plata, V., Gauthier-Maradei, P., & Kafarov, V. (2015). Influence of minor components on precipitate formation and filterability of palm oil biodiesel. *Fuel*, 144, 130-136. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.043>
- Plata, V., Haagenson, D., Dağdelen, A., Wiesenborn, D., & Kafarov, V. (2015). Improvement of Palm Oil Biodiesel Filterability by Adsorption Methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(6), 893-903. doi:10.1007/s11746-015-2646-z
- Poppe, J. K., Garcia-Galan, C., Matte, C. R., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C., & Ayub, M. A. Z. (2013). Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 94, 51-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.010>
- Poppe, J. K., Matte, C. R., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C., & Ayub, M. A. Z. (2018). Transesterification of Waste Frying Oil and Soybean Oil by Combi-lipases Under Ultrasound-Assisted Reactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(3), 576-589. doi:10.1007/s12010-018-2763-x

- Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27(4), 398-408. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.008>
- Rodrigues, R. C., Godoy, C. A., Filice, M., Bolivar, J. M., Palau-Ors, A., Garcia-Vargas, J. M., . . . Guisan, J. M. (2009). Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, 44(6), 641-646. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.001>
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290-6307. doi:10.1039/C2CS35231A
- Rodríguez Arzave, J. A., Hernández Torres, M. A., Estrada Garza, E. A., & Santoyo Stephano, M. (2016). ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN DE MAYONESAS In (2 ed., Vol. 1, pp. 838-842): Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Sakthivel, G., Nagarajan, G., Ilangkumaran, M., & Gaikwad, A. B. (2014). Comparative analysis of performance, emission and combustion parameters of diesel engine fuelled with ethyl ester of fish oil and its diesel blends. *Fuel*, 132, 116-124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.059>
- Saleh, J., Tremblay, A. Y., & Dubé, M. A. (2010). Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. *Fuel*, 89(9), 2260-2266. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.04.025>
- Senthilkumar, S., Sivakumar, G., & Manoharan, S. (2015). Investigation of palm methyl-ester biodiesel with additive on performance and emission characteristics of a diesel engine under 8-mode testing cycle. *Alexandria Engineering Journal*, 54(3), 423-428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.019>
- Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el uso de Biocombustibles. *Journal of technology management & innovation*, 6, 100-114.
- Serrano, M., Marchetti, J., Martínez, M., & José, A. (2015). *Biodiesel production from waste salmon oil: Kinetic modeling, properties of methyl esters, and economic feasibility of a low capacity plant* (Vol. 9).

- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2004). Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil. *Energy & Fuels*, 18(1), 154-159. doi:10.1021/ef030075z
- Silitonga, A. S., Masjuki, H. H., Mahlia, T. M. I., Ong, H. C., Chong, W. T., & Boosroh, M. H. (2013). Overview properties of biodiesel diesel blends from edible and non-edible feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 22, 346-360. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.01.055
- Silva, D., & Oliveira, L. (2013). *Relationship between cetane number and calorific value of biodiesel from Tilapia visceral oil blends with mineral diesel* (Vol. 1).
- Soegiantoro, G. H., Chang, J., Rahmawati, P., Christiani, M. F., & Mufrodi, Z. (2019). Home-Made Eco Green Biodiesel From Chicken Fat (CIAT) and Waste Cooking Oil (PAIL). *Energy Procedia*, 158, 1105-1109. doi:https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.01.267
- Sousa, V., Luz, S., Caldeira-Pires, A., S. Machado, F., & M. Silveira, C. (2017). *Life cycle assessment of biodiesel production from beef tallow in Brazil*.
- Swaminathan, C., & Sarangan, J. (2012). Performance and exhaust emission characteristics of a CI engine fueled with biodiesel (fish oil) with DEE as additive. *Biomass and Bioenergy*, 39, 168-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.001
- Tacias Pascacio, V. G., Rosales Quintero, A., & Torrestiana Sánchez, B. (2016). EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES RESIDUALES DE COCINA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL: UN CASO DE ESTUDIO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*; Vol. 32, Núm. 3 (2016). doi:10.20937/RICA.2016.32.03.05
- Tacias-Pascacio, V. G., Torrestiana-Sánchez, B., Dal Magro, L., Virgen-Ortíz, J. J., Suárez-Ruíz, F. J., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization. *Renewable Energy*, 135, 1-9. doi:https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.107
- Tacias-Pascacio, V. G., Virgen-Ortíz, J. J., Jiménez-Pérez, M., Yates, M., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel*, 200, 1-10. doi:https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.054

- Uauy, R., & Valenzuela, A. (2009). *Marine Oils: The Health Benefits of n-3 Fatty Acids* (Vol. 16).
- Vidotti, R., Giovani, E., & Gonçalves, S. (2019). *PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SILAGEM, FARINHA E ÓLEO DE TILÁPIA E SUA UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL **.
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627-3652. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020
- Wiggers, V. R., Wisniewski, A., Madureira, L. A. S., Barros, A. A. C., & Meier, H. F. (2009). Biofuels from waste fish oil pyrolysis: Continuous production in a pilot plant. *Fuel*, 88(11), 2135-2141. doi:https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.02.006
- Wisniewski Jr, A., Wiggers, V. R., Simionatto, E., Meier, H. F., Barros, A., & Madureira, L. (2010). *Biofuels from waste fish oil pyrolysis: Chemical composition* (Vol. 89).
- Yahyaee, R., Ghobadian, B., & Najafi, G. (2013). Waste fish oil biodiesel as a source of renewable fuel in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 17, 312-319. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.09.025

Apéndices

Apéndice A. Proceso de extracción del ARP.

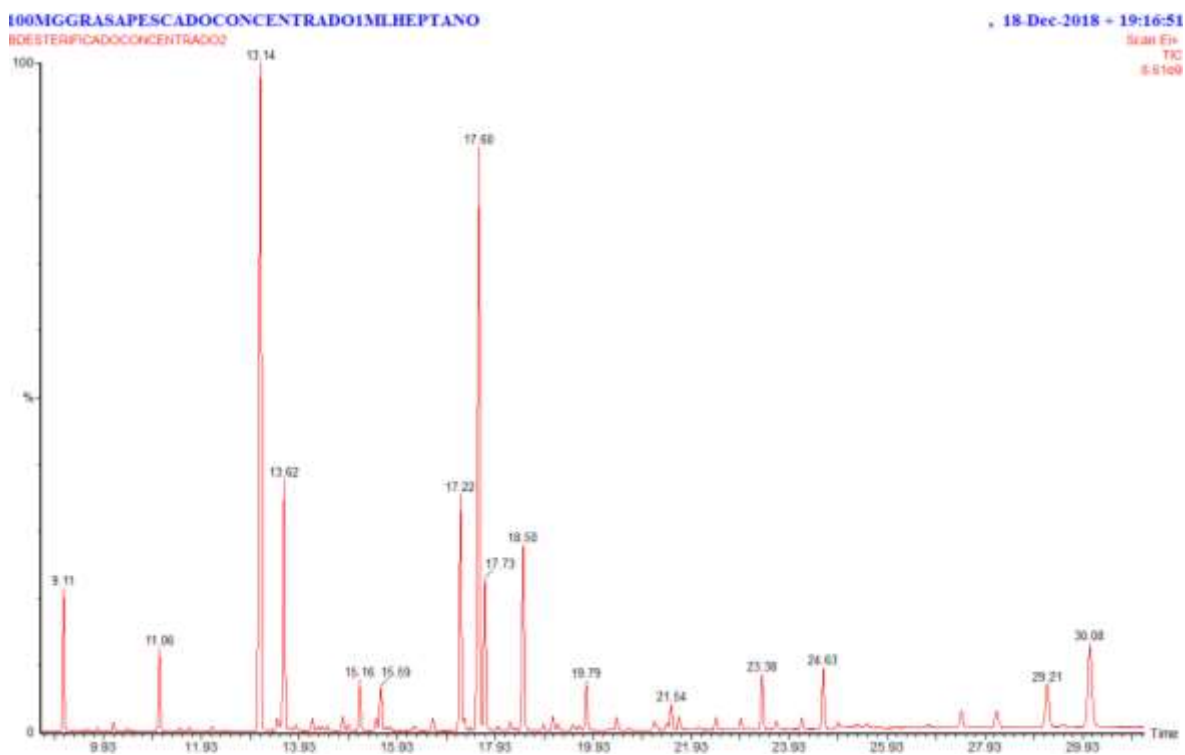
1. Las vísceras se cocinaron con dos volúmenes de agua en un recipiente metálico a alta temperatura (97 °C) durante 1,5 h y 400 rpm.
2. Después de cocinar, la mezcla se filtró en un colador de poliestireno y el filtrado se centrifugó a 4800 rpm durante 15 minutos.
3. Finalmente, el aceite obtenido se secó en un horno de vacío a 60 °C durante 24 h para eliminar el exceso de humedad, y luego se almacenó en un matraz ámbar a 4 °C hasta su uso.

Apéndice B. Condiciones de cromatografía para la determinación del perfil de ácidos grasos.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus SQ 8S GC acoplado a un espectrómetro de gases (GC/MS) con inyector automático, equipado con una columna altamente polar HP-INNOWAX (30m x 0.250mm d.i. x 0.25µm de espesor de película). Se inyectaron 1 µL de la muestra de metil esterres en heptano (1:50 split ratio). La temperatura del horno se programó desde 120 °C por 0 min; luego se incrementó hasta 220 °C a una velocidad de 4 °C/min y finalmente se mantuvo esta temperatura durante 45 min. Como gas acarreador se empleó helio de ultra alta pureza a un flujo de 1.5 mL/min.

La identificación de los ácidos grasos se analizó de acuerdo a sus tiempos de retención, teniendo como referencia la base de datos del espectro de masas.

Apéndice C. Perfil cromatográfico de ARP.



Apéndice D. Condiciones de cromatografía para la determinación del contenido de Fames.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos del biodiésel se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 5975C, conectado a una columna capilar BD-EN14103 (30m x 0.320 mm x 0.25 μ m) y un detector de ionización de llama (FID). La relación de división fue de 50:1, y se usó nitrógeno como gas portador a una velocidad de flujo de 2.0 ml/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 °C y 300 °C, respectivamente.

El programa de temperatura del horno se estableció inicialmente a 120 °C para 0 minutos y luego se calienta a 220 °C a 4 °C/min, manteniendo a 220°C durante 2 min, seguido del calentamiento de 220 °C a 250 °C a 15 °C/min (mantener durante 10 min). La cantidad de muestra inyectada fue de 1 μ L y el tiempo total para el análisis fue de 40 minutos.

Apéndice E. Norma UNE-EN 14214:2013. Esta norma europea especifica los requerimientos y los métodos de ensayo de los FAME, para determinar la calidad de un biodiésel.

Ensayo	Unidades	Límites		Norma de ensayo
		Mínimo	Máximo	
Contenido de éster	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Densidad a 15°C	Kg/m ³	860	900	EN ISO 3675
Viscosidad a 40°C	mm ² /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Punto de inflamación	°C	120	-	ISO 3679
Contenido en azufre	mg/Kg	-	10,0	EN 20846
Residuo carbonoso	% (m/m)	-	0,30	EN ISO 10370
Número de cetano		51,0	-	EN ISO 5165
Contenido en cenizas de sulfatos	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Contenido en agua	mg/Kg	-	500	EN ISO 12937
Contaminación total	mg/Kg	-	24	EN 12662
Corrosión en lámina de cobre	Clasificación	Clase 1		EN ISO 2160
Estabilidad a la oxidación	horas	6,0		EN 14112
Valor ácido	Mg KOH/ g muestra	-	0,50	EN 14104
Índice de Yodo	g/100g muestra	-	120	EN 14111
Metilester linolénico	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Metiléster poliinsaturados	% (m/m)	-	1	EN 15779

Ensayo	Unidades	Límites		Norma de ensayo
		Mínimo	Máximo	
Contenido en metanol	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Contenido en monoglicéridos	% (m/m)	-	0,80	EN 14105
Contenido en diglicéridos	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Contenido en triglicéridos	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Glicerina libre	% (m/m)	-	0,02	EN 14105
Glicerina total	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Metales grupo I (Na+K)	mg/Kg	-	5,0	EN 14108/14109
Metales grupo II (Ca+Mg)	mg/Kg	-	5,0	EN 14538
Contenido en fósforo	mg/Kg	-	10,0	EN 14107

Apéndice F. Norma ASTM D6751-09. Esta norma americana especifica los requerimientos y los métodos de ensayo de los FAME, para determinar la calidad de un biodiésel.

Propiedad	Límite		Unidad	Método de prueba
	Min	Max		
Punto de inflamación	93	-	°C	D 93
Control de alcohol				
Debe cumplir con una de las siguientes:	130	0,2	% masa	en 14110
1. Contenido de metanol			°C	D93
2. Punto de inflamación				
Agua y sedimento	-	0,050	% volumen	D2709
Número ácido	-	0,50	mg KOH / g	D664
Ceniza sulfatada	-	0,020	% masa	D874
Corrosión lámina de cobre	-	No. 3	-	D130
Residuo de carbono	-	0,050	% masa	D4530
Viscosidad cinemática	1.9	6,0	mm ² /s	D445
Número de cetano	47	-	-	D613
Punto de turbidez	Reporte		°C	D2500
Filtrabilidad de impregnado en frio	-	360	Segundos	-
Estabilidad de oxidación	3	-	horas	en 14112
Glicerina libre	-	0,020	% masa	D6584
Glicerina total	-	0,240	% masa	D6584
Sodio y potasio, combinados	-	5	ppm (µg/g)	en 14538
Calcio y magnesio, combinados	-	5	ppm (µg/g)	en 14538
Azufre*	-	0,0015	% masa	D5453
		0,05	(ppm)	

Propiedad	Límite		Unidad	Método de prueba
	Min	Max		
Contenido de fósforo	-	0,001	% masa	D4951
Temperatura destilación, Temperatura atmosférica equivalente, 90% recuperado		360	°C	D1160