

**OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DEL ACEITE DE JATROPHA
CURCAS POR ALCOHÓLISIS, UTILIZANDO LIPASA *THERMOMYCES
LANUGINOSUS* (LIPOZYME TL, IM)**

EDWIN OSWALDO VARGAS AFANADOR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DEL ACEITE DE JATROPHA
CURCAS POR ALCOHÓLISIS, UTILIZANDO LIPASA *THERMOMYCES
LANUGINOSUS* (LIPOZYME TL, IM)**

EDWIN OSWALDO VARGAS AFANADOR

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Químico**

Directora

Janeth Aidé Perea Villamil

Química, MSc. Doctora en Química

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS, CICTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

AGRADECIMIENTOS

Al centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, CICTA, por toda la colaboración prestada.

A la Doctora Janeth Aidé Perea, por su paciencia, tiempo y dedicación en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los calificadores por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Centro de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales – CENIVAM

A la Ingeniera Yurany Acosta Giraldo, por su colaboración en los experimentos realizados, en el desarrollo de este proyecto y por sus aportes.

A la Universidad Industrial de Santander.

A mis padres, Luis Ernesto Chacon Vargas y Maria Eugenia Afanador, quienes siempre me alentaron y apoyaron en las situaciones más difíciles.

A mis tíos maternos, Hernando afanador y Leonilde Osma,

DEDICATORIA

A mis padres, Luis Ernesto Chacon Vargas y Maria Eugenia Afanador, quienes siempre me alentaron y apoyaron en las situaciones más difíciles, a mi hermana Maria Isabel, que siempre fue un reflejo que las cosas se pueden hacer cuando se desean hacer con amor y sacrificio.

A la mujer que amo, y que comparte mi vida, en sus momentos de angustia y alegrías, que siempre ha confiado en mí, por su entrega y dedicación, gracias princesa hermosa, gracias Yurany Acosta Giraldo.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. ACEITE DE <i>JATROPHA CURCAS</i>	20
1.2. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.....	22
1.3. TIPOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN.....	24
1.3.1. OBTENCIÓN DE METILÉSTERES DE ACEITES VEGETALES.....	25
2. ESTADO DEL ARTE.....	28
3. MARCO LEGAL.....	31
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
4.1. MATERIALES Y REACTIVOS	33
4.2. REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS	33
4.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	35
4.3.1. Índice de acidez (Ia).	35
4.3.2. Análisis de ácidos grasos.	36
4.3.3. Análisis de ésteres y acilglicérols	36
4.4. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE REACCIÓN.	37
4.5. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA.	38
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	40
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE <i>JATROPHA CURCAS</i>	40
5.2. REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS	41
5.3. SELECCIÓN DE CONDICIONES DE REACCIÓN.	41
5.3.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA ANOVA.	44
5.4. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN.	46

5.5. ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA.	50
5.6 EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE JATROPHA CURCAS.	52
6. CONCLUSIONES	56
7. RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS.....	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de la J. Curcas, Sistema Cronquist.	20
Tabla 2. Características del aceite de <i>Jatropha curcas</i>	21
Tabla 3. Composición en acilglicérols del aceite de <i>Jatropha curcas</i>	21
Tabla 4. Composición de ácidos grasos del aceite de <i>Jatropha curcas</i>	21
Tabla 5. Diferentes aceites usados en la producción de biodiesel.	22
Tabla 6. Especificaciones del Biodiesel en Estados Unidos, la comunidad Europea y Colombia (a partir de Julio, 1996).	32
Tabla 7. Características de la lipasa Lipozyme TL, IM.	33
Tabla 8. Rangos de temperatura y tiempos usados en el Cromatógrafo HTGC.	37
Tabla 9. Variables independientes y niveles de diseño	38
Tabla 10. Puntos del diseño experimental.	39
Tabla 11. Perfil de ácidos grasos del aceite de <i>Jatropha curcas</i>	40
Tabla 12. Índice de acidez del aceite y pretratamiento de la enzima.	42
Tabla 13. Conversión de la reacción de alcoholisis según el resultado del diseño experimental.	42
Tabla 14. Análisis de varianza para la conversión de etilésteres.	44
Tabla 15. Efectos estimados para la conversión de etilésteres.	45
Tabla 16. Valores de las condiciones óptimas de reacción.	49
Tabla 17. Transesterificación y comparación de las condiciones óptimas finales con trabajos que utilizan Lipozyme TL, IM.	54
Tabla 18. Transesterificación de <i>Jatropha c.</i> utilizando diferentes tipos de catalizadores.	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fruto de la <i>Jatropha curcas</i> (izquierda), semilla (derecha)	19
Figura 2. Reacciones generales de transesterificación.....	24
Figura 3. Reacción de alcoholólisis en triglicéridos	25
Figura 4. Montaje utilizado para llevar a cabo la reacción de alcoholólisis (izquierda), aceite de <i>Jatropha curcas</i> (derecho superior), balón 1440 con enzima TL IM después de un lavado (derecha inferior).	34
Figura 5. Diagrama de efectos principales para la conversión de etilésteres (Y1-%).....	43
Figura 6. Diagrama de Pareto para la conversión de etilésteres	45
Figura 7. Superficie de respuesta para la conversión de etilésteres con la temperatura constante en su valor central.....	47
Figura 8. Superficie de respuesta para el porcentaje para el porcentaje de etil ésteres, con la cantidad de enzima en su valor central.	48
Figura 9. Superficie de respuesta para la conversión de etilésteres con el tiempo de reacción en su valor central.	49
Figura 10. Superficie de respuesta para los valores óptimos de reacción con la relación de enzima igual a 1.68.	50
Figura 11. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL,IM en las condiciones, óptimas de reacción.....	51

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. perfil cromatográfico del producto de la relación de alcoholisis en condiciones óptimas (92.26 etilésteres).....	68

RESUMEN

TÍTULO: OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DEL ACEITE DE JATROPHA CURCAS POR ALCOHÓLISIS, UTILIZANDO LIPASA *THERMOMYCES LANUGINOSUS* (LIPOZYME TL, IM)^{*}

AUTOR: Vargas Afanador, Edwin Oswaldo ^{**}

PALABRAS CLAVES: Transesterificación, aceite de *Jatropha curcas*, esterés alquílicos, diseño experimental, biodiesel, lipasa inmovilizada.

DESCRIPCIÓN

Actualmente en el mundo se desarrolla un gran esfuerzo en la investigación, tratando de buscar nuevas fuentes de combustibles que replacen a los combustibles fósiles, pues es importante encontrar nuevos procedimientos para el desarrollo de productos a partir de plantas como *Jatropha curcas*, ya que produce 707,15 Kg-Ha-año. Teniendo en cuenta lo anterior este trabajo abordó el estudio de reacción de alcoholisis que tiene gran aplicación a nivel industrial, utilizando como materia prima el aceite de *Jatropha curcas* con etanol, en un sistema libre de solvente, utilizando como catalizador lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL, IM), también se evaluó la estabilidad operativa de la enzima.

Las variables que se analizaron fueron: relación de enzima (7, 9 y 11% con relación a 20g de aceite), tiempo (60, 120 y 180 minutos) y temperatura (50, 55 y 60°C). Para la reacción de transesterificación se emplearon como sustratos aceite de *Jatropha curcas*, y etanol anhidro grado analítico en una relación molar de 1:4. Como catalizador se usó la lipasa estereoespecífica (*sn-1,3*) *Thermomyces lanuginosus*, **se llevaron a cabo 23 experimentos en un reactor bacth y utilizando una velocidad de agitación con una propela marica de 3cm de diámetro a 200 rpm, en las condiciones operacionales seleccionadas** Para su calentamiento, se utilizó un baño termostático (± 1 °C), se tomaron los mayores rendimientos para establecer las condiciones óptimas de reacción y con esto evaluar la estabilidad operativa de la enzima.

Las condiciones óptimas de reacción fueron: temperatura: 60°C, relación de enzima: 12.36%, tiempo de reacción: 185 min, con estas condiciones se obtuvieron conversiones de etilésteres de 92.26%. La estabilidad de la enzima se evaluó reutilizando esta, haciendo lavados cada 185min, para un total de 5. Con un rendimiento de 85.53% en el 5 lavado.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Janeth Aidé Perea Villamil.

SUMMARY

TITLE: PROCUREMENT OF BIODIESEL FROM OIL JATROPHA CURCAS BY ALCOHOLYSIS, THERMOMYCES LANUGINOSUS LIPASE USING (LIPOZYME TL IM)*

AUTHOR: Vargas Afanador, Edwin Oswaldo **

KEYWORDS: Transesterification of Jatropha curcas oil, alkyl esters, experimental design, biodiesel, immobilized lipase.

DESCRIPTION

Currently, research is being developed in the world by making a significant effort, and in the attempt to find new sources of combustible that replace fossil fuels, it is important to find new procedures for product development from plants like Jatropha curcas, producing 707 15 Kg-Ha-year. Considering all the above described, this work emphasized the study of alcoholysis reaction which has great application at industrial level, using as raw material oil with ethanol Jatropha curcas in a solvent free system using as catalyst lipase from Thermomyces lanuginosus (Lipozyme TL IM), and the operational stability of the enzyme was also evaluated.

The analyzed variables were: ratio of enzyme (7, 9 and 11% compared to oil 20g), time (60, 120 and 180 minutes) and temperature (50, 55 and 60 ° C). For the trans esterification reaction were used as substrates Jatropha oil, and analytical grade anhydrous ethanol in a molar ratio of 1: 4. Stereospecific lipase catalyst (Sn-1.3) was used Thermomyces lanuginosus, 23 experiments were conducted in a batch reactor and a stirring speed implementing a 3cm diameter propeller at 200 rpm, at selected operating conditions a thermostat bath (± 1 ° C) was used for heating, the highest yields were taken to establish the optimal reaction conditions and thereby assess the operational stability of the enzyme.

The optimal reaction conditions were: temperature: 60 ° C, ratio of enzyme: 12.36%, reaction time: 185 min, under these conditions conversion of ethyl esters of 92.26% were obtained. Stability of the enzyme was evaluated by reusing this, making each 185min washes, for a total of 5. yield 85.53% at 5th wash.

* Work Degree.

** Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Janeth Aidé Perea Villamil

INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo se desarrolla un gran esfuerzo para buscar nuevas fuentes de combustibles que replacen a los combustibles fósiles. Un ejemplo de esto es Brasil, que para los años 70, comenzaba su carrera de investigación en este plano, pero no fue hasta el año 2003, que con la ayuda del gobierno fomentaron iniciativas económicas, sociales y políticas para dar el gran paso de cambiar inicialmente el combustible fósil por combustibles como el biodiesel. De este modo para finales del año 2004 fue lanzado el programa nacional de producción y uso del biodiesel (PNPB), este exigió al gobierno diversos estudios, medidas y providencias con miras a incluir, en el marco legal y regulatorio brasileño relacionado a los combustibles.

Tomando como referencia la experiencia de Brasil, en Colombia se está promoviendo el uso de biocombustibles a partir de caña de azúcar y de aceite de palma. En la actualidad se cuenta con 499.497 Ha sembradas y 117.140 Ha en desarrollo (Fedepalma - áreas, 2014), que estimulan la producción de aceite de palma crudo, el cual, para el año 2010 fue de 753.039 Ton (toneladas), con un crecimiento anual del 10.47% (Fedepalma-producción, 2014), también se exportan productos de la agroindustria de palma de aceite como jabones (12.302 Ton-año, 2014), margarinas e hidrogenados (10.496 Ton-año, 2014).

Además de la Palma y debido a la acogida y el beneficio social que trae, el cultivo de especies oleaginosas, al generar nuevos empleos y mejores condiciones sociales, en la actualidad se están evaluando otras fuentes de grasas y aceites, como el cocotero, el aguacate, la higuera, la colza, el maní, la soya, el girasol y la *Jatropha curcas*, ya que esta última comparada con la colza, soya, girasol y el maní, que tienen un rendimiento de 498,95; 449,05; 381,02; 403,70 kilos-Ha-año, respectivamente, y produce 707,15 kilos-Ha-año es decir casi el doble que todas las demás (Arias., A. F, 2006).

La *Jatropha curcas* se convierte en una alternativa para la generación de nuevos productos en el mercado. En los países del Sub-Sahara (África), India, Suroccidente de Asia y China esta planta es muy valiosa por sus propiedades fisicoquímicas, y su larga vida, que llega a los 30 años en producción (Tamalampudi y col, 2008). Para el año 2008, la *Jatropha curcas* ya se había plantado en un estimado de 900 mil Ha en todo el mundo y de esto un 85% fue en Asia, 13% en África y el resto en América Latina y para el año (2015) se provee que estén sembradas 12.8 millones de Ha a nivel mundial (Wu, 2011). En Colombia el aceite de *Jatropha curcas* no ha sido explotado, a diferencia de otros países como la India donde se emplea en preparación de pesticidas, leña, abono orgánico, fertilizante, jabón y usos medicinales (Xiao y col, 2011).

El aceite de *Jatropha curcas* por su composición particular en ácidos grasos (oleico, linoleico y palmítico) puede aprovecharse en la fabricación de esteres grasos y otros oleoquímicos que se emplean como materia prima de diversos productos, haciendo uso de técnicas limpias basadas en los planteamientos del desarrollo sostenible y la química verde (Pabón y Rodríguez, 2012), (Carrasco y col 2013)

Los aceites vegetales han sido utilizados como materias primas para combustible en los motores diesel convencionales; pero la gran viscosidad que tienen genera un problema en el bombeo, debido a la mezcla ineficaz del aceite vegetal con aire, lo que genera una combustión incompleta. Por lo anterior, la mejor manera de utilizar los aceites vegetales como combustible para motores de encendido espontáneo (CI) es convirtiéndolo en biodiesel (Prueksakorn y Gheewala, 2008). Adicionalmente, los aceites vegetales son biodegradables, no tóxicos, y tienen un potencial para reducir perceptiblemente la contaminación, por lo cual sus derivados reducen substancialmente las emisiones de óxidos de sulfuro (SO_x), monóxido de carbono (CO), de hidrocarburos carbonados polivinílicos (PAH) del humo, y del ruido en el motor. (Agarwal y Agarwal, 2007).

La principal ventaja de utilizar biodiesel como combustible es que contiene un 11% de oxígeno en peso y no contiene azufre, disminuyendo las emisiones de las partículas sólidas. Así mismo, mejora la lubricidad del combustible, aumentando la vida útil de los motores (Banapurmath y col, 2008; Zhang y col, 2012) también reduce la dependencia de los combustibles fósiles, la emisión de material particulado de la combustión en un 50%, de la misma manera ayuda a disminuir el calentamiento global, debido que emite menos CO₂ en su ciclo de vida que el fijado mediante el proceso de fotosíntesis por las plantas usadas para producirlo. Tiene una combustión más completa que el diesel, disminuye en un 90% la cantidad de hidrocarburos no quemados y en 80% los aromáticos (Agarwal y Agarwal, 2007; Joshi y col, 2013)

Uno de los métodos más utilizados para modificar los aceites vegetales, y convertirlos en biodiesel, es la alcoholisis (transesterificación) que puede llevarse a cabo en presencia de catalizadores químicos o enzimáticos. En el caso de la catálisis química, exige la separación del catalizador (Ghasemi y Dehkordi, 2014) y esto se refleja en el costo de energía necesario al utilizarlos, por lo cual, se recomienda el uso de enzimas (lipasas) como catalizadores alternos.

Las lipasas son catalizadores que facilitan la reacción, y no son agresivos con el medio ambiente, tienen especificidad por el sustrato, requieren condiciones de trabajo suaves de reacción, bajas temperaturas, presión atmosférica, baja agitación, y su costo comparado con otro tipo de catalizadores es bajo (Singh y col, 2008; Antczak y col, 2009; Liang y col, 2012)

La Novo Nordisk comercializa la lipasa 1,3 estereoespecífica de *Thermomyces lanuginosus* en forma inmovilizada, la cual es una alternativa favorable, si se tiene en cuenta que su precio en el mercado es 6 (seis) veces menor que el de las otras enzimas comerciales utilizadas (enzimas de *Mucor miehei* y *Candida antarctica*).

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo abordó el estudio de la reacción de alcoholólisis que tiene gran aplicación a nivel industrial, utilizando como materia prima el aceite de *Jatropha curcas* y etanol, en un sistema libre de solvente, en presencia de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL, IM). También se evaluó la estabilidad operativa de la enzima.

El uso de *Jatropha curcas* como materia prima utilizando esta enzima no ha sido considerada por otros investigadores a nivel mundial. La investigación se llevó en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) de la Universidad Industrial de Santander

1. MARCO TEÓRICO

Jatropha curcas es una planta monóica, tóxica y oleaginosa. Es un arbusto vigoroso de hábito perenne, que logra crecer de 1-8 metros y en algunos casos hasta 20 metros de altura. Tiene un tallo recto con corteza gris o rojiza; presenta escamas lúcidas y es de color verde ceniciento (Kumar y Sharma, 2008; Yang y col, 2009).

Carl von Linneo describió la planta en 1753 y le dio su nombre actual *Jatropha Curcas* L. (*Jatropha*: jatra -doctor, trophe- necesidad de alimento, curcas es nombre Indio o turco) (Prueksakorn y Gheewala, 2008). Existen alrededor de doscientos nombres comunes para esta planta, los cuales indican que la *Jatropha. curcas* tiene una amplia distribución en la naturaleza.

El fruto es una capsula casi esférica, de color marrón oscuro, mide de 1.5 a 3 cm de diámetro, es dehiscente y trilobular, con una semilla en cada cavidad. La semilla es elíptica, pesa de 0.5 a 0.75g, mide de 16 a 20 mm de largo, es negra con numerosos puntos amarillentos, las semillas están constituidas por una cascara externa muy dura que encierra una almendra formada por un albumen aceitoso y blanquecino como se muestra en la figura 1.

La Jatropha curcas tiene alrededor de 170 especies (Ranade y col, 2008), que están distribuidas a lo largo del mundo en zonas con temperaturas tropicales, como la India, China y Japón que son sus principales cultivadores y en segunda medida los países de América Central, Guatemala, Honduras y El Salvador.

En India se tienen cerca de nueve especies Jatropha curcas L., Jatropha heynei Balak., Jatropha gossypifolia L., Jatropha multifida L., Jatropha glandulifera Roxb., Jatropha intergerrima Jacq., Jatropha nana Dalz. Y Gibs., Jatropha podagrica Hook., Jatropha multifida L., y Jatropha tanjorensis Ellis y

Saroja. De estas *J. intergerrima* Jacq., *J. podagrica* Hook y *multifidaly* que son cultivadas en jardines con propósitos ornamentales, mientras que *J. curcas* L. y *J. gossypifolia* L son cultivadas para varios usos que incluyen, manufactura de lubricantes, jabones, velas, antiparasitario, astringente, tintas para colorear (Ranade y col, 2008; Sammaiah y col, 2014), fertilizante, pesticida, fungicida (Achten y col, 2008).

Figura 1. Fruto de la *Jatropha curcas* (izquierda), semilla (derecha)



Fuente: Akintayo, 2004.

También tiene usos medicinales, es así como en Nigeria e India se le da uso tradicional en la cura de las hemorroides, gonorrea, infertilidad, infecciones de la piel, (Akintayo, 2004). En la tabla 1, se presenta la clasificación de la *Jatropha curcas* por el Sistema Cronquist

La *J. curcas* presenta ventajas respecto a otras oleaginosas debido a que: (Singh y col, 2008):

- Puede ser sembrada en cualquier tipo de terreno, incluyendo tierras arenosas, salinas, marginales, pero en tierras fértiles su desarrollo vegetativo y producción de semillas es considerablemente mayor.
- No es apetecible para el ganado y se le conocen pocas plagas de importancia.
- Mejora las condiciones económicas y ambientales del país
- El aceite producido a partir de la semilla de *J. curcas* es semejante al diesel obtenido del petróleo.

Tabla 1. Clasificación de la *J. Curcas*, Sistema Cronquist.

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Euphorbiales
Familia	Euphobiaceae
Genero	Jatropha
Especie	Curcas L

1.1. ACEITE DE JATROPHA CURCAS.

El componente más importante de la *Jatropha curcas*, es su aceite, cuyo contenido en la semilla oscila entre un 40 y 60% (Shah y Gupta, 2007), (Devappa y col, 2010). Este es extraído en forma mecánica y química, (Forson y col, 2004; Aderibigbe y col, 1997) mecánicamente de manera manual alcanzando rendimientos entre 60 y 65% (Tewari, 2007), o con prensa de tornillo manejada con motor con la cual se logran rendimientos del 75% al 80% (Beerens, 2007). Para la extracción química solo se utiliza la semilla del fruto, y hexano como solvente, alcanzando rendimientos más altos, entre 95 y 99%, (Gubitz y col, 1999; Devappa y col, 2010)

En la tabla 2, se relacionan las propiedades fisicoquímicas del aceite de *Jatropha curcas* reportadas por varios investigadores y en las tablas 3 y 4 la composición en acilglicéridos y la composición en ácidos grasos respectivamente.

Tabla 2. Características del aceite de *Jatropha curcas*.

PROPIEDADES	Foidl y col, 1996	Akintayo, 2003	Chitra y col, 2005	Achten y col, 2008	Vyas y col, 2009
Gravedad específica(g/mL)	0.920	0.919	0.913	0.914	0.912
Índice de acidez(mg KOH g ⁻¹)	-----	3.5	3.095	3.71	----
Índice de yodo (mg yodo g ⁻¹)	106.6	105.2	-----	101	-----
Índice de saponificación(mg g ⁻¹)	190.1	198.85	-----	182.8	185
Ácidos grasos libres (%)	0.60-1.27	1.76	6.16	2.18	5.29

Tabla 3. Composición en acilglicéridos del aceite de *Jatropha curcas*.

Clase de lípido	Foidl y col, 1996	Akintayo, 2003	Achten y col, 2008
monoglicérido	No detectado(nd)	2.2	nd-1.7
Diglicérido	2.7	6.0	2.5-2.7
triglicérido	97.3	63.7	88.20-97.30

El aceite de *Jatropha curcas*, comparado con aceite de girasol, palma, coco y palmiste que se muestran en la tabla 4, es más rico en ácidos, palmítico, esteárico, oleico y linoleico, este último es uno de los ácidos poliinsaturados más importantes por que previene distintas enfermedades cardiovasculares (Akintayo, 2004).

Tabla 4. Composición de ácidos grasos del aceite de *Jatropha curcas*.

ACIDO GRASOS	Coco, rodriguez y amado, 2006	Girasol, sarín, 2007	Soybean, sarín, 2007	Palmiste, Alamu y col, 2008	Palma, kansedo y col, 2008	Jatropha c. Singh y col, 2014
CAPROICO, C-6	0.4	----	----	3.4	----	----
LAURICO, C-12	47.8	-----	----	48.2	0.1	----
MIRÍSTICO, C-14	18.1	0.2	0.1	16.2	1.0	----

ACIDO GRASOS	Coco, rodriguez y amado, 2006	Girasol, sarín, 2007	Soybean, sarín, 2007	Palmiste, Alamu y col, 2008	Palma, kansedo y col, 2008	Jatropha c. Singh y col, 2014
PALMITICO, C-16	8.9	4.8	11	8.4	42.8	17.57
PALMITOLEICO, C-16	----	0.8	0.1	----	----	1.209
HEPTADECANICO, C-17	----		----	----	----	----
ESTEARICO, C-18	----	5.7	4	2.5	4.5	7.49
OLEICO, C-18	2.7	20.6	23.4	15.3	40.1	32.46
LINOLEICO, C-18	6.4	66.2	53.2	2.3	10.1	41.25
LINOLENICO, C-18	1.6	0.8	7.8		0.2	----
ARAQUIDICO, C-20	-----	0.4	0.3	----	----	----

1.2. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

La producción de biodiesel como combustible renovable es más importante cada día, debido a la preocupación existente por la alta contaminación de los combustibles fósiles y la disminución de reservas del petróleo en el mundo.

Actualmente, el biodiesel se produce comercialmente en Europa y los E.E.U.U. para reducir la contaminación atmosférica y las emisiones del gas efecto invernadero (Phankosol y col, 2014). Este producto se obtiene de los aceites de soya, girasol, oliva, palma, palmiste, linaza. En la tabla 5, se relacionan los rendimientos en la producción de biodiesel alcanzados utilizando diferentes aceites vegetales (Hernández y Méndez, 2008), (Díaz y Borges, 2012), (Goldstein, 2014).

Tabla 5. Diferentes aceites usados en la producción de biodiesel.

Tipo de aceite	Rendimiento %	Año	Autores
Girasol	78-96	2004	Madras y col
Pongamia pinnata	92- 98	2005-2006	Meher y col; Karmee y

Tipo de aceite	Rendimiento %	Año	Autores
			Chadha
Madhuca indica	98	2005	Ghadge y Raheman
Chlorella protothecoides	63-mas del 80 de conversión.	2006	Miao y Wu; Xu y col
Canola usado en fritura	94.6 - 98	2006	Leung y Guo
Nicotiana tabacum (tabaco)	91 en 30 minutos L	2006	Veljkovic y col
Soybean	95 - 100	2006	Furuta y col; Ji y col
Jatropha curcas	mayor al 99	2007	Tiwari y col
Karanja	85 - 89.5	2007	Sharma y Singh
Usado en la cocina	97.02	2007	Ou y col
Residuos grasos	81.42	2010	Castaño
Oil castor	80.1	2011	Hincapié y col
Aceite de Higuerilla	64.61	2012	Sanchez y Huertas
Oil rubber	75	2014	Abdulkair

La mayoría de los aceites reportados en la anterior tabla presentan problemas operacionales y de durabilidad en los motores de combustión interna (CI), pues la alta viscosidad de los aceites vegetales origina inconvenientes en el motor al ser bombeados (Pramanik, 2003). Además, la mezcla ineficaz de los aceites vegetales con aire contribuye a la combustión incompleta, por eso uno de los problemas de los aceites vegetales dentro de los motores diesel, es el coquizado o presencia de carbón en los inyectores, también se presenta el espesamiento y la gelificación del aceite lubricante resultado de la contaminación de los aceites dentro del motor (Banapurmath y col 2008; Mize y col, 2013).

Estudios recientes buscan la mejor utilización de aceites vegetales mediante el uso de microemulsiones, pirolisis, craking catalítico y/o transesterificación. Esta ultima una de las usadas a escala industrial (Díaz y Borges, 2012)

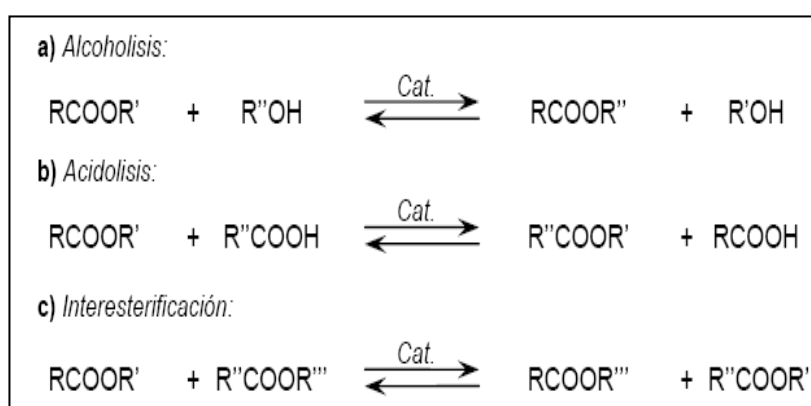
1.3. TIPOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN.

El biodiesel se puede utilizar en forma pura o puede ser mezclado con diesel para formar diversas mezclas, puede ser empleado en motores de CI con muy poco o nada de modificaciones al motor, porque tiene características similares al diesel (Agarwal y Agarwal 2007). Uno de los métodos más comunes usados para reducir la viscosidad en el biodiesel es la transesterificación (Demirbas, 2007; Rathore y col, 2014)

La transesterificación es una reacción química entre un triglicérido y un alcohol en presencia de un catalizador (Sharma y col, 2008; Behnia y col, 2011) e implica tres reacciones diferentes dependiendo del tipo de sustrato empleado. Un éster reacciona con un alcohol (a-alcoholisis), con un ácido carboxílico (b-acidólisis), o con otro éster (c-interesterificación) como se muestra en la figura 2 (Montero, 2008).

Estas reacciones pueden llevarse a cabo utilizando un catalizador químico (ácidos, bases y óxidos) o un biocatalizador (lipasas), (Ma y Hanna, 1999; Golstein, 2014)

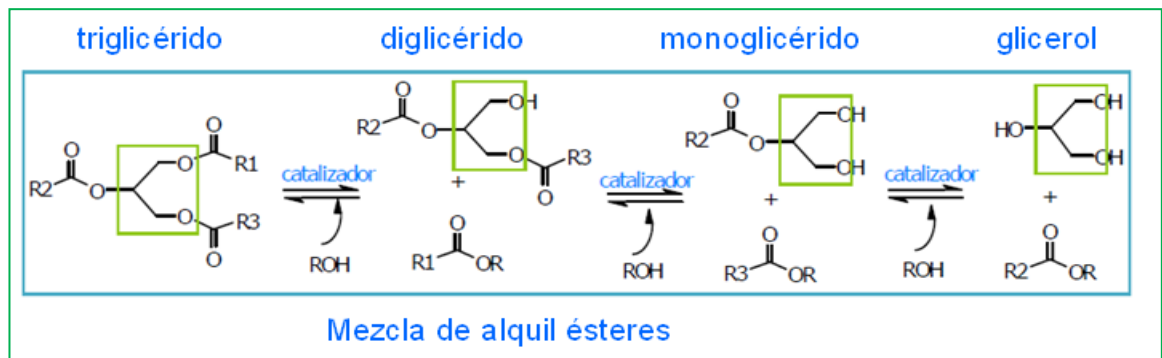
Figura 2. Reacciones generales de transesterificación.



La transesterificación implica una secuencia de tres reacciones consecutivas reversibles, donde el triglicérido es convertido en diglicérido, el diglicérido es convertido en monoglicérido, seguido por la conversión del monoglicérido en

glicerol. En cada paso se produce una molécula éster, de forma que en total se forman 3 moléculas por cada molécula de triglicérido (Diaz y Lopez, 2005; Castro y Duran, 2006; Sharma y col 2008, Demirbas, 2008). Las reacciones de equilibrio de las etapas de transesterificación se muestran en la figura 3.

Figura 3. Reacción de alcoholólisis en triglicéridos



1.3.1. Obtención de Metilésteres de Aceites Vegetales. Los triacilglicérols están presentes en los aceites y grasas de origen animal y vegetal y como alcoholes se usan los lineales de cadena corta y bajo peso molecular. La reacción entre el aceite y el alcohol está condicionada por el tipo de alcohol, la relación molar alcohol/aceite, además del tipo de catalizador, el tiempo de reacción, la temperatura, la velocidad de agitación y el contenido de ácidos grasos libres (Shieh y col, 2003; Sharma, 2008).

- **Tipo de alcohol:** Los alcoholes usados para la producción de biodiesel abarcan el metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol, y isobutanol. Los alcoholes con una masa molecular más alta, tienen la densidad y temperatura de ebullición mayor. Los alcoholes más utilizados por su precio y producción a gran escala son el metanol y el etanol (Nelson y col, 2009; Su y Wei, 2014).
- **Relación molar alcohol-aceite:** Una de los más importantes variables que afectan el rendimiento de ésteres es la relación molar alcohol/triglicérido. La relación estequiométrica para la transesterificación requiere tres moles de

alcohol y una mol de glicérido para obtener un rendimiento de tres moles de éster del ácido graso y uno mol de glicerol, de esta manera se utiliza un exceso de alcohol para que el desplazamiento de la reacción vaya hacia los productos formándose así los ésteres del triglicérido. La producción más alta del ésteres metílicos se puede alcanzar con una relación molar aceite/alcohol de 1: 6. (Dizge y Keskinler, 2008).

- **Tipo de catalizador:** El tipo de catalizador utilizado en la transesterificación influye de manera significativa en el rendimiento de los esterres derivados del aceite. Los catalizadores usados pueden ser ácidos, básicos o enzimáticos. Los básicos comprenden, hidróxido de potasio y de sodio (Leung y Guo, 2008), los ácidos, ácido sulfúrico, fosfórico o sulfato férrico (Tiwari y col, 2007). Con los catalizadores ácidos se obtienen rendimientos elevados (99%), pero la reacción es muy lenta, siendo necesarias temperaturas elevadas (> a 100 °C) y más de tres (3) horas para alcanzar rendimientos aceptables (Schuchardta y col, 1998). Además este proceso da lugar a problemas relacionados con la acción corrosiva del ácido (Serio y col, 2005), La catálisis alcalina sucede más rápidamente (30 - 60 minutos) y es menos corrosiva, pero se produce agua en la reacción, causando la hidrólisis del éster producido y la formación de jabón.

Los dos tipos de catalizadores antes mencionados presentan problemas de remoción después de la reacción, ya que la presencia de agua da como resultado emulsiones estables y la respectiva saponificación, dificultando la separación de los ésteres (Schuchardta y col, 1998).

Las lipasas pueden también catalizar con eficacia la transesterificación de triglicéridos en sistemas acuosos o no acuosos, y trabajar bajo condiciones suaves, temperaturas bajas (30 - 60 °C), no hay hidrólisis, y el subproducto, glicerol, se puede recuperar fácilmente sin ningún proceso complejo, también los ácidos grasos libres contenidos en los aceites y las grasas se pueden convertir totalmente a los ésteres metílicos (Xie y Wang, 2014).

- **Temperatura y tiempo de la reacción:** En reacciones enzimáticas al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de reacción y la producción de esteroides, sin embargo, las enzimas son proteínas y pueden ser desnaturalizadas cuando éstas son calentadas más allá de una temperatura óptima (Kumari y col, 2009).
- **Velocidad de agitación:** La intensidad de agitación es muy importante debido a que los aceites son inmiscibles en las soluciones de metanol e hidróxido de sodio. Una vez las dos fases se mezclan y la reacción empieza, la agitación se convierte en un factor que no tiene transcendencia alguna (Hernández y Méndez, 2008).
- **Efecto de los ácidos grasos libres y la mezcla:** El contenido de los ácidos grasos libres (FFAs), son ácidos no esterificados en el aceite, que después de la esterificación ácida deben ser mínimo o menos el de 2%. Estos FFAs reaccionan con el catalizador alcalino produciéndose jabones en lugar de ésteres (Sharma y col, 2008).
- **Efecto de co-solventes orgánicos:** El solvente orgánico mejora la solubilidad de los sustratos y mantiene la actividad de la enzima. En muchos casos, el sistema óptimo para la reacción enzimática, consiste en una mezcla de los solventes orgánicos (Antczak y col, 2009). Los solventes orgánicos se utilizan en síntesis enzimática para conseguir biodiesel y aumentar el rendimiento de transesterificación, mejora la solubilidad mutua de triglicéridos hidrofóbicos y de alcoholes hidrofílicos. También la solubilidad del propanol y el butanol en aceites es mucho más alta que la del metanol y del etanol, por lo tanto estos dos primeros alcoholes no necesitan el solvente orgánico adicional (Khor y col, 2008; Kumar y col, 2012). Además, como fue mencionado los solventes orgánicos protegen las enzimas contra la desnaturalización por altas concentraciones de alcoholes tales como metanol y etanol.

2. ESTADO DEL ARTE

El uso de los aceites vegetales para la producción de biodiesel ha sido ampliamente estudiada en el mundo entero, algunos estudios muestran el uso de aceite de palma y catalizadores sólidos, como óxido de zinc (ZnO), y óxido de magnesio (MgO). También se han utilizados catalizadores químicos (Berchmans y Hirata, 2007; Singh y col., 2014) para la reacción de transesterificación como el H₂SO₄, NaOH y KOH, variando la cantidad de sustrato (metanol - aceite), tiempo de reacción y la temperatura para obtener Metilésteres del aceite de *Jatropha curcas* (Tiwari y col., 2007; Díaz y Borges, 2012), debido a que son una nueva alternativa de combustible.

Como fuente de TAG's en la reacción de alcoholisis se ha empleado diversos aceites como el de palma, con el que se alcanzan altos rendimientos por encima del 94%, utilizando la enzima Lipozyme Thermomyces Lanuginosus, Inmovilizada (Rodríguez y Amado, 2006). De la misma manera investigaciones realizadas por diferentes autores, han mostrado que las lipasas *Chromobacterium viscosum inmovilizada* en Celite-545, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *R miehei*, *Carica papaya lipase* y *Thermomyces lanuginosus* son las que presentan mayor actividad en reacciones de alcoholisis. Las investigaciones mencionadas anteriormente, han dado un rendimiento de biodiesel de 90, 98 y 99% (LU y col., 2008; Su y Wei, 2014).

Da la misma manera se han hecho combinaciones del aceite de *Jatropha curcas* y aceite de palma, debido a que el aceite de palma tiene problemas para ser utilizado a bajas temperaturas, esta mezcla llego a tener un mayor optimización con una composición de 60:40 *Jatropha curcas*. y aceite de palma, lográndose así las mejores propiedades en la combustión a bajas temperaturas en los motores de inyección directa (Sarin y col., 2006).

En el Instituto Tecnológico de la India, en departamento de Química, en New Delhi, utilizaron tres tipos de lipasas como catalizadores para la preparación de biodiesel a partir del aceite de *Jatropha curcas*, lipasas de: *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugos* y *Porcine páncreas*. Con la enzima *Chromobacterium viscosum* se logró producción del 71% para metilésteres (Shah y col., 2008).

En investigaciones con lipasas como la Novozym 435 y diferentes alcoholes (metanol, etanol, n propanol y n-butanol) se han obtenido rendimientos de 97 y 98% de metilésteres a partir del aceite de *Jatropha curcas* con una temperatura de 30 °C y un tiempo de reacción de 75 minutos en promedio (Tamalampudi y col., 2008; Su y Wei, 2014)

En el V Congreso Prospectiva de la Industria Petrolera Colombiana “Clúster del Petróleo: Retos y Oportunidades” se presentó el trabajo que se viene haciendo en el Salvador usando la *J. curcas*. Se exhibió un importante estudio, que mostro que; por cada 6.37 Kg de aceite, se le retiran las impurezas y se somete a la reacción de alcoholísis, se obtiene como producto 6.05 Kg de biodiesel y 0.91 Kg de glicerol; en este mismo estudio se muestra los resultados de producción en una plantación con una densidad de 1.666 plantas por Ha, que en 5 años alcanza la producción máxima.

En Colombia a partir del 2007, se han venido realizando varios proyectos implementando la siembra de la *Jatropha curcas* en el país. Algunos de estos son: (1) Determinación de las zonas con biofísica e identificación de materiales genéticos para el establecimiento y desarrollo agroindustrial de la *Jatropha curcas* en la Guajira, Meta, Vichada y Tolima, todas investigaciones dirigidas por Corpoica; (2) Evaluación de la calidad del biodiesel obtenido de oleaginosas autóctonas y el comportamiento energético y ambiental del biodiesel, realizada por la Universidad de Antioquia en Medellín; (3) Reforestación de la cuenca de Rio Negro, mediante la propagación másica de insumos para la producción de energías alternativas, realizadas por el Centro Internacional de Física en el departamento de Cundinamarca; (4) La

implementación de 1562 parcelas sembradas de *Jatropha curcas* a familias beneficiarias en el marco del programa de soberanía alimentaria de Colombia sin Hambre, como alternativa económica en las zonas rurales del país (García, 2010); (5) Implementación del proyecto producción y comercialización de *Jatropha curcas* como materia prima para la industria de biocombustible por pequeños productores del departamento de sucre (www.contratos.gov.co, 2013, consultado 19 diciembre 2014)

El germoplasma de la *Jatropha curcas* está constituido por la colección jatropha colombiana que posee 290 entradas, conformada por dos grupos: a) material local con 272 accesiones locales procedentes de 22 departamentos del país y b) material foráneo con 18 materiales comerciales procedentes de países con mayor área cultivada del mundo (Brasil y India).

Los países con mayor progreso en estudios de *Jatropha curcas* y la implementación de esta para la producción de biodiesel son principalmente México, Brasil, Indonesia, Malasia, India, entre otros. A nivel local los únicos que proyectos serios con *Jatropha* los realiza Corpoica, Agroforestal de Colombia y Agrocombustibles de Colombia.

3. MARCO LEGAL

En mayo de 2003, la Unión Europea (UE), adoptó una directiva para promover el uso de biocombustibles de forma que a diciembre del 2005 se debería incorporar el 2% de biodiesel, aumentando paulatinamente hasta llegar al 5.75% a finales del 2010. En Colombia el 30 de diciembre de 2004 se expidió la ley 939 que estimula la producción y comercialización de biocombustibles de origen vegetal o animal para uso en motores diesel.

El artículo 6 de esta ley señala *“Para efectos de interpretar y aplicar la presente ley se entiende por Biocombustibles de origen vegetal o animal para uso en motores diesel aquel combustible líquido o gaseoso que ha sido obtenido de un vegetal o animal que se puede emplear en procesos de combustión y que cumplan con las definiciones y normas de calidad establecidas por la autoridad competente, destinados a ser sustituto parcial o total del ACPM utilizado en motores diesel.”* y su literal g) reza: *“Aceites Vegetales Puros. Aceites producidos de vegetales a través de presión, extracción o procedimientos similares, crudos o refinados, pero no modificados químicamente cuando son compatibles con el tipo de motores en los que se utilizarán.”* Y en sus artículos 8 y 9 reza que los biocombustibles de origen animal o vegetal de producción nacional con destino a la mezcla de ACPM estarán exentos de impuestos, dando esto un gran apoyo a los cultivadores de plantas que generen biocombustibles.

El ministerio de Minas y Energía expidió la resolución 1289 de septiembre 7 de 2005 por el cual se modifica parcialmente la Resolución 898 del 23 de agosto de 1995, en el sentido de regular los criterios de calidad de los biocombustibles para su uso en motores diesel como componente de la mezcla con el combustible diesel de origen fósil en procesos de combustión esta resolución establece los requisitos de calidad del combustible diesel corriente y sus mezclas con biocombustibles.

A nivel mundial la norma ASTM D6751 describe al biodiesel como esteres de ácidos grasos de cadena larga provenientes de grasas animales o vegetales.

En la tabla 6 se describen las especificaciones para el biodiesel puro (100%) en EE.UU, según la norma ASTM 6751, Comunidad Europea según norma EN 14214, y la Norma Técnica Colombiana NTC 5444 de 2006 (Datos tomados de Mesa, Fedepalma, 2014)

Tabla 6. Especificaciones del Biodiesel en Estados Unidos, la comunidad Europea y Colombia (a partir de Julio, 1996).

PROPIEDADES	UNIDAD	ASTM6751 ESTADOS UNIDOS	EN 14214 COMUNIDD EUROPEA	NTC 5444 COLOMBIA
DENSIDAD (15°C)	g/mL	-----	0,86 – 0,90	0,86 – 0,90
VISCOSIDAD A 40°C	mm ² /s	1,9 -6,0	3,5-5,0	1,9 -6,0
NUMERO DE CETANO	Cetanos	min 47	min 51	min 47
PUNTO DE CHISPA	°C	min 130	min 120	min 120
PUNTO DE FLUIDEZ	°C	Reportar	Depende de la región	Reportar
ESTABILIDAD A LA OXIDACIÓN	Horas	min 3	min 6	min 6
ESTABILIDAD TERMINA	%Reflect	N.R	N.R	min 70
INDICE DE YODO	g yodo/100g	N.R	máx 120	máx 120
CORROSIÓN LAMINA DE CU	N/A	1	1	1
NUMERO ACIDO	mg KOH/g	0,8 máx	0,5 máx	0,5 máx
CONTENIDO DE AGUA	mg/Kg	500 máx	500 máx	500 máx
CONTENIDO DE FOSFORO	mg/Kg	max 10	max 10	max 10
CONTENIDO DE METANOL O ETANOL	%masa	0,2	0,2	
CONTENIDO DE GLICERINA LIBRE/TOTAL	%masa	0,02/0,24	0,02/0,25	0,02/0,24
CONTENIDO DE ESTER	mg/Kg	96,5	96,5	96,5
CONTENIDO DE Na + K	mg/Kg	max 5	max 5	max 5
CONTENIDO DE Ca + Mg	mg/Kg	max 5	max 5	max 5

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Para la reacción de transesterificación se emplearon como sustratos, aceite de *Jatropha curcas* suministrado por Colombiana de Biocombustibles S.A y etanol anhidro grado analítico, como catalizador se usó la lipasa estéreo-específica (*sn-1,3*) *Thermomyces lanuginosus*, conocida comercialmente como *Lipozyme TL, IM*, suministrada por Novozyme S.A. las características de la enzima se muestran en la tabla 7

Tabla 7. Características de la lipasa Lipozyme TL, IM

Actividad enzimática en base seca	> 250 *IUN/g
Densidad de carga seca	450 Kg/m ³
Densidad de carga humedad	415 Kg/m ³
Densidad absoluta	1830 Kg/m ³
% de humedad	5.5
Tamaño de partícula	300-1000 µm; con la mayor fracción entre 400 – 600 µm. las partículas son virtualmente incompresibles
*1 IUN (Interesterification Unit Novo) es equivalente a la velocidad inicial de conversión de triesterina en condiciones analíticas estándar.	

4.2. REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS

La reacción de alcoholisis se llevó a cabo en un reactor batch con capacidad de 100 mL como el mostrado en la figura 4. Para su calentamiento, se utilizó un baño termostático ($\pm 1^\circ\text{C}$) el cual permitió mantener la temperatura constante durante la reacción de transesterificación y para la agitación se utilizó una propela marina con un diámetro de 3 cm.

Figura 4. Montaje utilizado para llevar a cabo la reacción de alcoholisis (izquierda), aceite de *Jatropha curcas* (derecho superior), balón 1440 con enzima TL IM después de un lavado (derecha inferior).



En todas las reacciones se emplearon como sustratos aceite de *Jatropha curcas* y etanol en relación molar 1:4. Esta relación se escogió teniendo en cuenta que la relación estequiometrica de la reacción es 1:3 (triacilglicérol/alcohol), y que en los estudios realizados por Shieh y col, 2003; Ramadhas y col, 2005; Shah y Gupta, 2007; Tamalampudi y col, 2008; Kumari y col, 2009; Antczak y col 2009, se recomienda el uso de un ligero exceso de alcohol para desplazar el equilibrio hacia la reacción de transesterificación.

La enzima fue sometida a un pretratamiento para eliminar el aire y el agua, con el fin de prevenir la hidrólisis y asegurar que el aceite penetre los poros del

soporte. Para la extracción del aire se aplicó vacío al sistema y para la remoción del agua se realizaron tres lavados con aceite, agitación y temperatura constante.

Una vez culminado el pretratamiento, la enzima obtenida se mezcló con la cantidad de aceite requerida para la reacción de alcoholisis y se incubó en un baño termostático a la temperatura establecida en un rango de 50 a 60 °C. A continuación se adicionó el alcohol, iniciándose en este punto el conteo de tiempo de reacción dado para cada experimento (entre 60 a 180 minutos). Una vez finalizada la reacción, se sumergió la mezcla en un baño de hielo para inactivar la enzima, seguidamente se realizó la filtración y el producto obtenido se almacenó en atmósfera de nitrógeno a baja temperatura (para su posterior análisis).

Todas las reacciones se llevaron a cabo sin adición de agua al sistema, teniendo en cuenta que la reacción de alcoholisis se ve beneficiada en condiciones anhidras, como ha sido reportado por Iso y col., 2004; Neureddini y col, 2005; Rodríguez y Amado, 2006; Hernández y Méndez, 2008; Su y Wei, 2014.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a velocidad de 200 rpm, en las condiciones operacionales seleccionada en el diseño experimental, ya que a esta velocidad no se presentan restricciones de difusión externa e interna (Amado y Rodríguez, 2006; Hernández y Méndez, 2008).

4.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

4.3.1. Índice de acidez (Ia). Se define como los miligramos de KOH necesarios para saturar los ácidos grasos libres contenidos en un gramo de aceite o grasa. Su determinación se realizó de acuerdo con el método AOAC 940.20/1990, y para su cálculo se empleó la siguiente ecuación:

$$I_a = \frac{V \cdot N \cdot 56.1}{P \cdot M}$$

Donde: V: volumen de la solución valorante.
N: normalidad de la solución valorante
PM: peso de la muestra del aceite en gramos
56.1: peso molecular de KOH.

4.3.2. Análisis de ácidos grasos. La composición en ácidos grasos del aceite fue determinada empleando cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC- FID), según las normas ISO 5508 (“Animal and Vegetable Fats and Oils – Analysis by Gas Chromatography of Methyl Ester of Fatty Acids”). Como materiales de referencia certificados se emplearon la mezcla Supelco™ 37 component FAME Mix, Supelco, y la mezcla de estándares de metilésteres de ácidos grasos GLC-10, GLC-50, GLC-80, GLC-100, Matreya, INC. El análisis cromatográfico del aceite se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 6890N (Agilent Technologies.), la columna empleada en el análisis fue DB-235 (J & W Scientific) [50%-cianopropil-poli (metilsiloxano), 60m x 0.25 mm x 0.25 µm]. La inyección se realizó en modo splits (10:1) (V_{iny} : 2µL). Los componentes se identificaron por comparación directa de sus tiempos de retención.

4.3.3. Análisis de ésteres y acilglicéroles. Los ésteres grasos, mono-di- y triacilglicéroles en los productos de alcoholisis se determinaron simultáneamente empleando cromatografía de gases de alta temperatura, HTGC. Todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases (HP 5890 series II), dotado con detector de ionización en llama (FID), usando una columna capilar metálica Rastek MXT-65TG, 65% difenil, 35% dimetil polisiloxano; temperatura máxima 370 °C, polaridad intermedia, diseñada para análisis de ésteres grasos, ácidos grasos libres y triacilglicéroles (Skoog y col, 2001).

Los análisis se realizaron usando la siguiente secuencia: temperatura inicial 70°C, a razón de 70°C/min se alcanzó una temperatura de 220°C, luego de un minuto a razón de 0.5°C/min se llegó a 225°C, después de dos minutos a 225°C, se alcanzó una temperatura de 360°C a una razón de 70°C/min. El gas de arrastre fue helio, puerto de inyección usado en modo Split a 250°C y detector FID a 360°C. Los rangos de temperaturas se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Rangos de temperatura y tiempos usados en el Cromatógrafo HTGC

	Rango (°C /min)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Nivel 1	70	220	1
Nivel 2	0.5	225	2
Nivel 3	70	360	24
El gas de arrastre usado fue helio, el puerto de inyección en método Split a 250 °C y detector FID a 360 °C			

4.4. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE REACCIÓN.

Para evaluar las condiciones de reacción se empleó como sustrato el aceite de *Jatropha curcas* – etanol en relación molar 1:4. Las variables que se analizaron fueron: cantidad de enzima, tiempo y temperatura de reacción. Los intervalos de ensayo se establecieron con base en los resultados obtenidos por Shiah y Gupta, 2007; Amado y Rodríguez, 2007; Tamalampudi y col, 2007; Hernández y Méndez, 2008.

En la tabla 9, se presentan los rangos evaluados. La influencia de cada una de las variables y su interacción con la conversión, se estudió utilizando un diseño experimental de tres variables por tres niveles, como se muestra en la tabla 9, utilizando para el análisis de los datos obtenidos la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS.

Se evaluaron las variables en forma individual y las interacciones entre las mismas, posteriormente se fijaron las óptimas condiciones de reacción para lograr la máxima conversión de etilésteres.

La variable respuesta escogida, se definió como el porcentaje de conversión (Y1) de etilésteres.

Cada experimento se realizó por duplicado en todos los puntos obteniéndose un total de 46 experimentos como se observa en la tabla 10.

Tabla 9. Variables independientes y niveles de diseño

VARIABLE INDEPENDIENTE	SÍMBOLO	CÓDIGO DE LOS NIVELES		
		-1	0	1
Temperatura [°C]	X ₁	50	55	60
Relación de enzima [aceite/enzima]*	X ₂	7	9	11
Tiempo de reacción [minutos]	X ₃	60	120	180
Relación de enzima: corresponde al % tomado por 20g de aceite de <i>Jatropha c.</i>				

4.5. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA.

La enzima se utilizó en forma sucesiva en varias reacciones de alcoholisis realizadas bajo los mismos parámetros operacionales, empleando las condiciones de temperatura, tiempo de reacción y cantidad de enzima seleccionadas como condiciones óptimas de reacción. Una vez termina cada reacción se filtró la enzima y se utilizó en un sistema idéntico con las condiciones de reacción.

Tabla 10. Puntos del diseño experimental.

EXPERIMENTOS	Nivel de las variables codificado		
	TEMPERATURA	TIEMPO DE	RELACIÓN DE ENZIMA
1	0	0	0
2	-1	-1	1
3	1	1	-1
4	0	0	0
5	1,68179	0	0
6	0	1,68179*	0
7	0	0	0
8	-1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	-1	-1	-1
12	-1	1	-1
13	1	-1	1
14	0	0	0
15	0	0	1,68179
16	0	0	0
17	0	-1,68179	0
18	1	1	1
19	-1,68179	0	0
20	0	0	0
21	1	-1	-1
22	0	0	-1,68179
23	0	0	0

*puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE *JATROPHA CURCAS*.

Se caracterizó el aceite *Jatropha curcas* en cuanto el perfil de ácidos grasos, encontrándose que los principales componentes son el ácido Oleico con un 38.76 %, Linoleico con un 37.12 %, Palmítico 12.43% y Esteárico con un 7.33 %, tal como se muestra en la tabla 11. Comparado con otros aceites que se utilizan para la producción de Biodiesel, como es el aceite de palma, el aceite de *Jatropha curcas* es rico en ácidos grasos insaturados lo que lo hace susceptible a los procesos de oxidación, situación que debe tenerse en cuenta al proyectar su uso.

Tabla 11. Perfil de ácidos grasos del aceite de *Jatropha curcas*.

Ácidos grasos	Numero de carbonos	Porcentaje
CAPROICO	C – 6	0.20
CAPRILICO	C – 8	0.0011
LAURICO	C – 12	-----
MIRISTICO	C – 14	0.12
PENTADECANOICO	C – 15	0.016
PALMITICO	C – 16	12.43
PALMITOLEICO	C - 16	0.72
HEPTADECANOICO	C – 17	0.10
ESTEARICO	C – 18	7.33
OLEICO	C – 18	38.76
LINOLEICO	C - 18	37.12
LINOLENICO	C – 18	0.22
ARAQUIDICO	C – 20	0.22
EICOSENOICO	C – 20	0.08

En cuanto al índice de acidez se encontró que el aceite presenta un valor de 1.81, este porcentaje de ácidos grasos libres presentes en el aceite debe ser inferior al 5%, observamos que los ácidos grasos libres (índice de acidez) presentes en el aceite de *Jatropha curcas* está por debajo del porcentaje, lo que significa que está en el rango permisible. Un aceite menor al 5% de ácidos grasos libres, puede simplificar el proceso de producción de biodiesel (transesterificación), maximizar su eficiencia y rendimiento, reducir las pérdidas en forma de jabones, es decir se obtendrá un biodiesel de calidad.

5.2. REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS

Previa a la reacción de alcoholisis fue necesario realizar un pretratamiento a la enzima tal como se describió en el numeral 4.2, con el fin de tener en la reacción un índice de acidez que no inactive la enzima.

En la tabla 12 se presentan los valores de índice de acidez obtenidos después de cada etapa del pretratamiento. En la primera etapa se observa un alto índice de acidez comparado con el índice del aceite puro. Esto es debido a la humedad presente inicialmente en la enzima. A medida que se aplican los lavados a la enzima, el índice de acidez disminuye porque la humedad se va retirando paulatinamente. De esta forma al cabo del cuarto lavado el índice de acidez disminuyó de 12.80 a 5.67%.

5.3. SELECCIÓN DE CONDICIONES DE REACCIÓN.

Para evaluar el efecto de las variables de reacción se utilizó un diseño experimental cuyos resultados fueron analizados usando la metodología de superficie repuesta. En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos del diseño.

Tabla 12. Índice de acidez del aceite y pretratamiento de la enzima

PRETRATAMIENTO	ÍNDICE DE ACIDEZ
Aceite puro	1.81
1*.lavado, Vacío	12.80
2**	8.14
3	7.12
4	5.67
*Lavado con aceite al vacío por 15 minutos, **2-4 lavados sin vacío por 30 minutos, activación de la enzima.	

Tabla 13. Conversión de la reacción de alcoholisis según el resultado del diseño experimental

EXPERIMENTOS	TEMPERATURA [°C]	TIEMPO DE REACCIÓN	RELACIÓN DE ENZIMA [ACEITE/ENZIMA]	CONVERSIÓN DE LA REACCIÓN [%]
1	55	120	9	85,60
2	55	60	11	82,88
3	60	180	7	84,58
4	55	120	9	80,04
5	63.40 ¹	120	9	85,60
6	55	220.91	9	89,34
7	55	120	9	83,83
8	50	180	11	88,84
9	55	120	9	83,14
10	55	120	9	87,54
11	50	60	7	83,34
12	50	180	7	86,70
13	60	60	11	79,78
14	55	120	9	85,94
15	55	120	12.36	88,46
16	55	120	9	87,77
17	55	19.09	9	69,03
18	60	180	11	86,56
19	46.59	120	9	83,13
20	55	120	9	88,87
21	60	60	7	75,20
22	55	120	5.63	91,27
23	55	120	9	86,21
1. Puntos adicionales para la condición de rotabilidad				

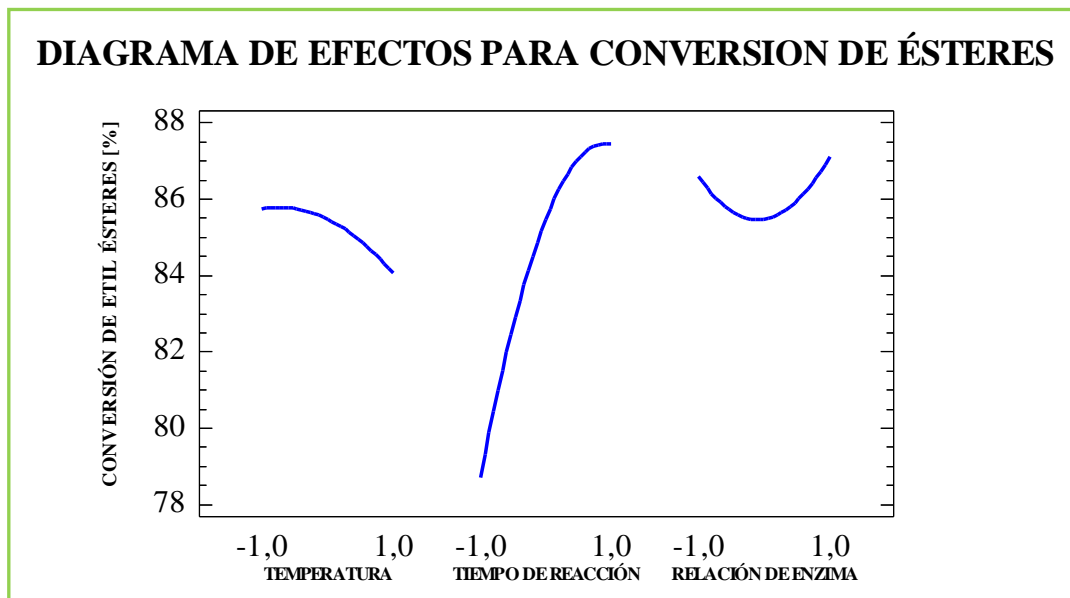
En el diagrama de efectos principales mostrado en la figura 5, la tendencia de cada línea refleja la influencia positiva o negativa de cada variable, en tanto que la pendiente permite establecer la evolución de la conversión de etilésteres en la reacción en el rango de los niveles evaluados. En el caso de la

temperatura se encuentra que; a medida que su valor aumenta disminuye la conversión de etilésteres.

En el caso de la relación de enzima, esta no es lineal con respecto a la producción de etilésteres, es decir, se observa un punto de inflexión para concentraciones intermedias de enzima, en este caso para valores de 7%. Las mayores conversiones se alcanzan en los valores extremos. A una relación de enzima bajos, como el del experimento 22, se logró un rendimiento del 91%.

El efecto de la variable tiempo de reacción sobre la conversión, muestra una relación lineal hasta un valor determinado a partir del cual se tiende hacia la estabilización de la conversión.

Figura 5. Diagrama de efectos principales para la conversión de etilésteres (Y1-%)



Se observa en todos los casos que cada una de las variables analizadas incide de manera diferente en la conversión, por lo cual se requiere un análisis integral en el cual se consideren todos los efectos simultáneamente para poder establecer las condiciones óptimas de reacción.

5.3.1. Análisis de la varianza ANOVA. Con el objeto de evaluar el efecto de las variables y sus interacciones, se continuó con el análisis de varianza (ANOVA) a partir del este se establece cuáles de los efectos son estadísticamente significativos. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Análisis de varianza para la conversión de etilésteres

FACTOR	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO PROMEDIO	VALOR F	VALOR P
Temperatura: A	9.66	1	1	0.98	0.34
Tiempo de reacción: B	260.26	1	1	26.43	0.0002
Relación de enzima: C	0.91	1	1	0.09	0.77
AA	5.20	1	1	0.53	0.48
AB	5.86	1	1	0.60	0.45
AC	2.99	1	1	0.30	0.59
BB	91.80	1	1	9.32	0.0092
BC	3.12exp-6	1	1	0.00	0.99
CC	29.99	1	1	3.05	0.10
Erro total	128.02	13	9.847		
Error corregido	535.31	22			
R² = 76.08		Error estándar = 3.32			
R² ajustado para los grados de libertad = 59.52 %		Error absoluto promedio = 2.08			
		F: prueba de significancia			
		P: probabilidad de error			

En este caso, dos efectos, el tiempo de reacción y el cuadrático BB del tiempo de reacción, poseen un valor **P** menor que 0.05, mostrando con ello que esta variable es significativamente diferente de cero un en un nivel de confianza del 95%.

Los resultados obtenidos se corroboran con el diagrama de Pareto (figura 6), donde se muestra el efecto de las variables y cómo interactúan. En este caso la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar) mostrado en la tabla 15. Las barras que se extienden más allá de la línea azul corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95%. En cuanto al color los efectos señalados con morado, es decir el tiempo de reacción y la relación de enzima inciden de forma favorable

sobre el porcentaje de conversión, en tanto que la temperatura tiene una incidencia desfavorable sobre la misma.

Figura 6. Diagrama de Pareto para la conversión de etilésteres

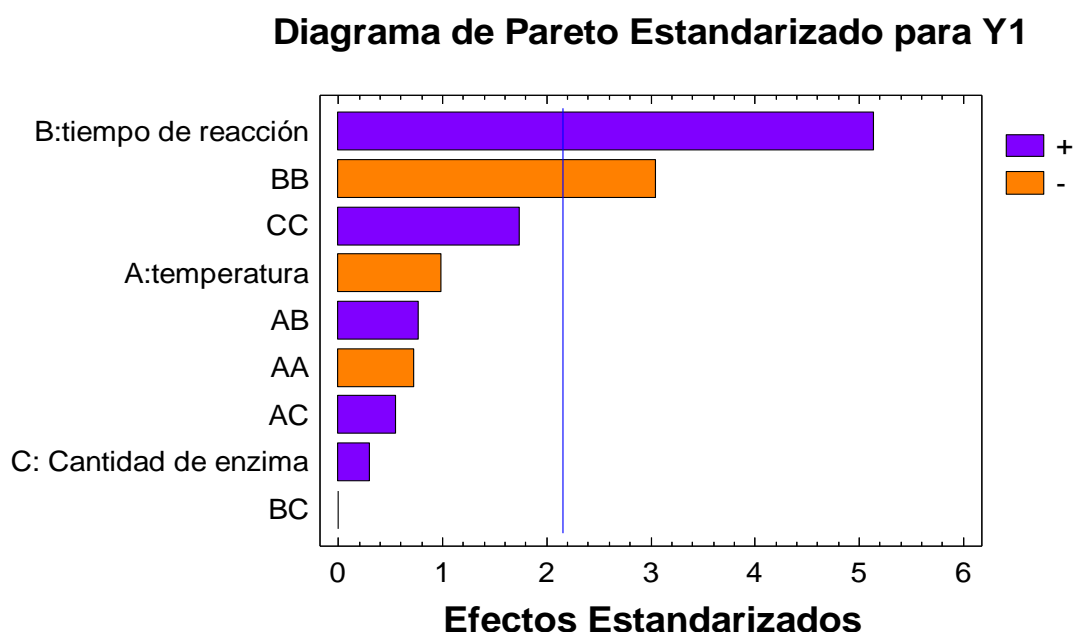


Tabla 15. Efectos estimados para la conversión de etilésteres.

TÉRMINOS		EFECTO ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR
lineal	Promedio	85.46	1.04
	Temperatura: A	-1.68	1.69
	Tiempo de reacción: B	8.73	
	Relación de enzima: C	0.51	
Cuadrático	A*A	-1.14	1.57
	B*B	-4.80	
	C*C	2.74	
Interacciones	A*B	1.71	2.21
	A*C	1.22	
	B*C	-0.0012	

De otra parte, a partir de los datos obtenidos con el análisis de varianza, se obtuvo el modelo predicho para la reacción de alcoholisis que se muestra en la ecuación 2, en ella los términos lineales A, B y C corresponden a la temperatura de reacción, tiempo de reacción y relación de enzima. En este modelo puede observarse que el tiempo de reacción (B) y el tiempo de reacción cuadrático (BB) inciden en forma significativa sobre la conversión,

bajo las condiciones indicadas en el diseño experimental. Los efectos cruzados de las interacciones entre las variables no son significativos y en este estudio, la relación de BC es nula.

Ecuación 2:

$$Y_1 = 85,458 - 0,8413*A + 4,365*B + 0,257*C - 0,572*A^2 + 0,856*AB + 0,612*AC - 2,403*B^2 - 0,000625*BC + 1,374*C^2$$

5.4. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN.

Con el fin de seleccionar las condiciones óptimas de reacción en las cuales se alcanzan los mayores niveles de conversión, se aplicó el modelo indicado en la ecuación 2 para obtener las gráficas de superficie respuesta, en este caso, al evaluar la interacción entre dos variables manteniendo la tercera constante.

En la figura 7, se presenta la superficie de respuesta obtenida al conjugar la relación de enzima y el tiempo de reacción, manteniendo la temperatura constante en su valor central. Los valores más altos de conversión de etilésteres se logran cuando en la reacción se emplea una relación de enzima del 7 y 11% y un tiempo de reacción de 180 minutos respectivamente.

La curva que hace referencia a la cantidad de enzima muestra inicialmente una conversión menor del 84% para los valores entre -0.2 a 0.2, y un punto de inflexión en el nivel central con pendiente igual a cero y conversión al 86.5%. En este caso la pendiente se hace positiva para valores mayores entre 0.2 y 1 de relación de enzima, a los cuales se alcanzan conversiones entre el 89 y 91%.

El tiempo de reacción presenta una pendiente positiva que tiende a ser cero a mayor cantidad de enzima, como se observa en la figura 7, aumenta la

conversión del 80% en los rangos entre -1 y -0,6, a conversiones por encima del 90% en los rangos de 0,6 a 1.

En la figura 8, se observa que los efectos combinados, temperatura y tiempo de reacción con respecto a la relación de enzima en el valor central dan un máximo 88% de conversión. Esta conversión corresponde a un tiempo de reacción de 180 minutos y una temperatura 58 °C, de los niveles más altos evaluados. Este porcentaje se debe a la pendiente con un valor cercano a 1 de la superficie de respuesta con respecto al tiempo de reacción.

Figura 7. Superficie de respuesta para la conversión de etilésteres con la temperatura constante en su valor central.

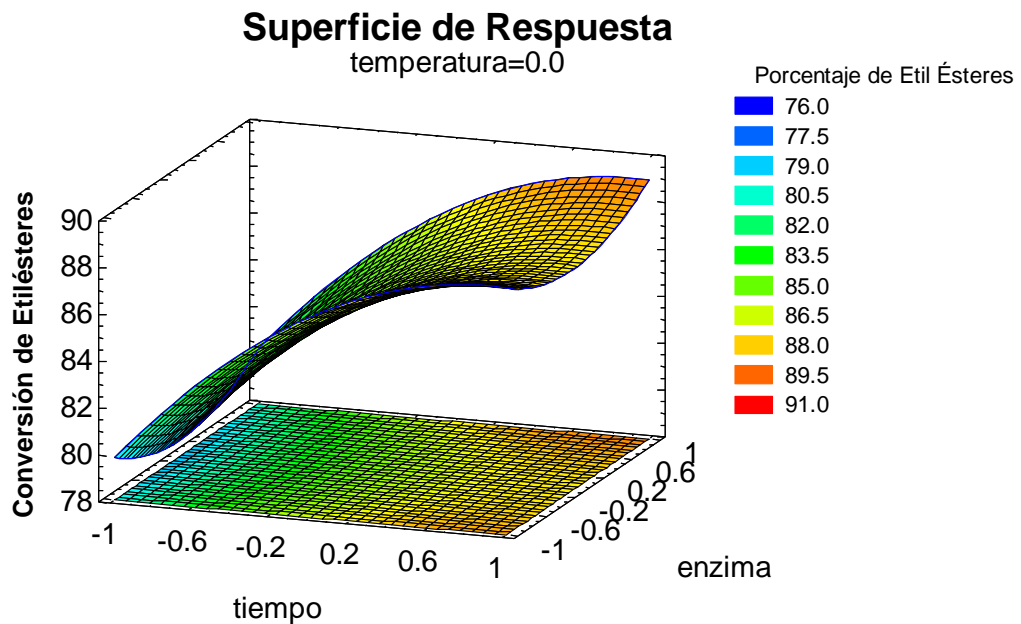
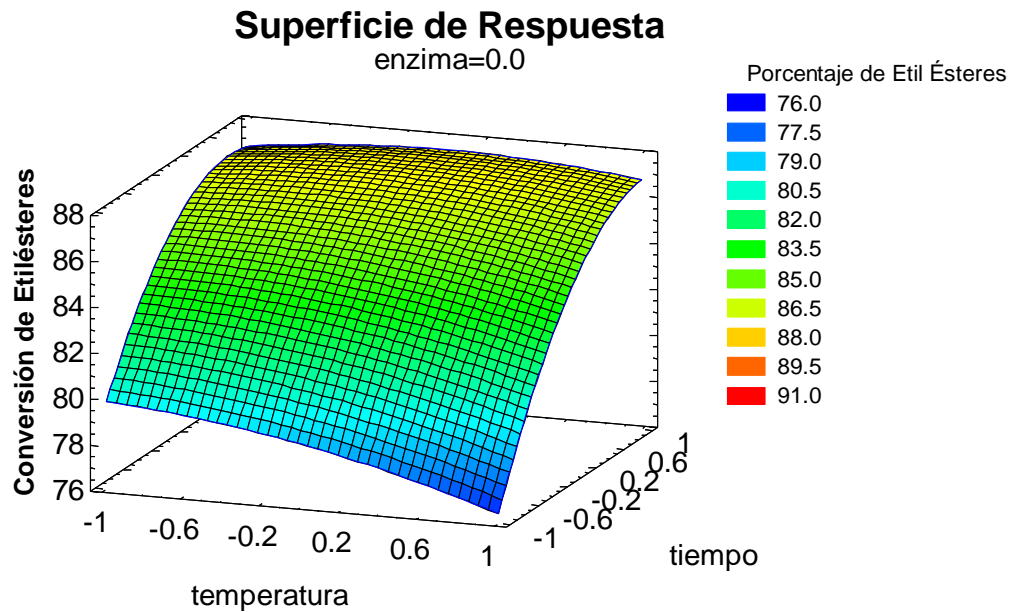


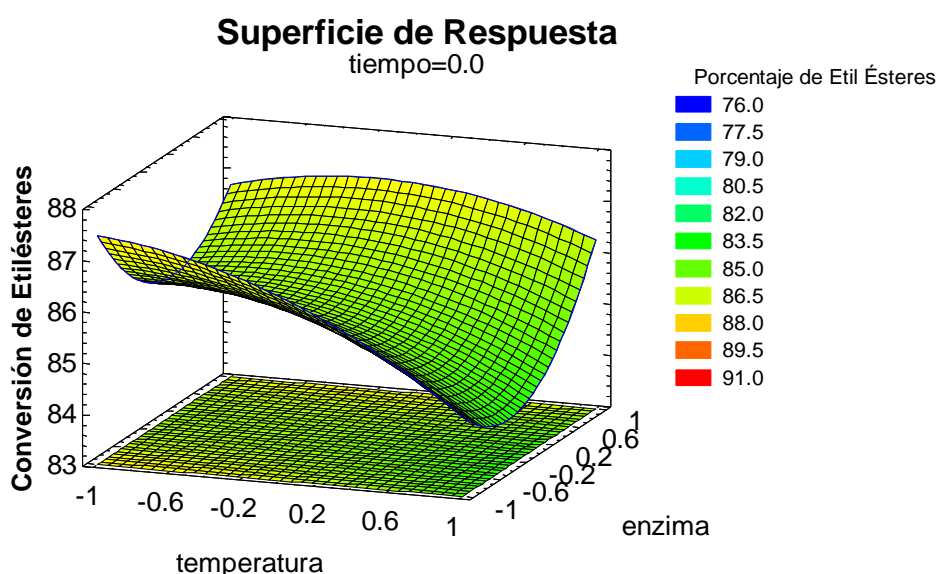
Figura 8. Superficie de respuesta para el porcentaje para el porcentaje de etil ésteres, con la cantidad de enzima en su valor central.



Si se analiza la influencia de la cantidad de enzima y la temperatura manteniendo constante el tiempo de reacción en su valor central (figura 9), se establece que, para lograr valores altos de conversión es necesario utilizar una relación de enzima bajo (5.6 – 7%) o altos (11%), como se establece en la tabla 13 de conversión de reacción de alcoholisis, aspecto que en la figura de superficie de respuesta de nota con la temperatura de 55 °C.

La superficie de respuesta, figura 9, muestra que la relación de enzima tiene en su nivel 0 (cero) valores mínimos de conversión (entre el 80 y 83%), a medida que pasa del nivel 0 a 1 en la relación de enzima y de 0 a -1, en la temperatura la conversión de etilésteres aumenta (entre 85 y 88%).

Figura 9. Superficie de respuesta para la conversión de etilésteres con el tiempo de reacción en su valor central.



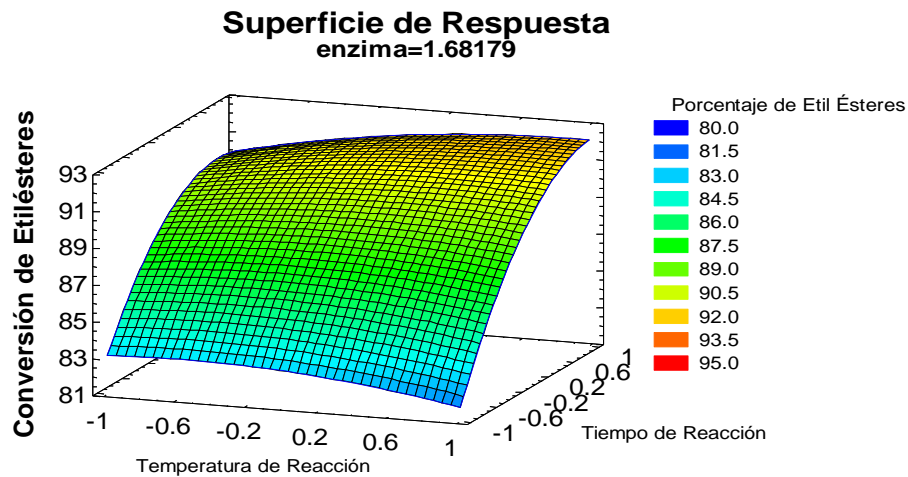
Con base en los resultados obtenidos, se aplicó la metodología de optimización multivariable, con la que se analiza de forma simultánea el efecto de la cantidad de enzima, la temperatura y el tiempo de reacción sobre la variable de respuesta Y1 (conversión de etilésteres). El resultado de este análisis permite definir las condiciones de reacción a las cuales se alcanzará la máxima conversión. En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos, y en la figura 10 el grafico de superficie de respuesta para los valores predichos.

Tabla 16. Valores de las condiciones óptimas de reacción.

Factor	Código de nivel	Porcentaje
	Óptimo	óptimo
Temperatura	0.97	59.87 °C
Relación de enzima[aceite/enzima]	1.68	12.36 %*
Tiempo de reacción	1.08	185 min

*Relación de enzima: corresponde al % tomado por 20g de aceite de Jatropha

Figura 10. Superficie de respuesta para los valores óptimos de reacción con la relación de enzima igual a 1.68.



Para corroborar las condiciones óptimas dadas por el modelo (60 °C, relación de enzima (aceite/enzima) de 12.36% y 185 minutos), se realizó la reacción por triplicado, encontrándose una diferencia porcentual de 0.03% entre el valor predicho (92.22%) y el valor obtenido, 92,26%, situación que confirma la validez del modelo.

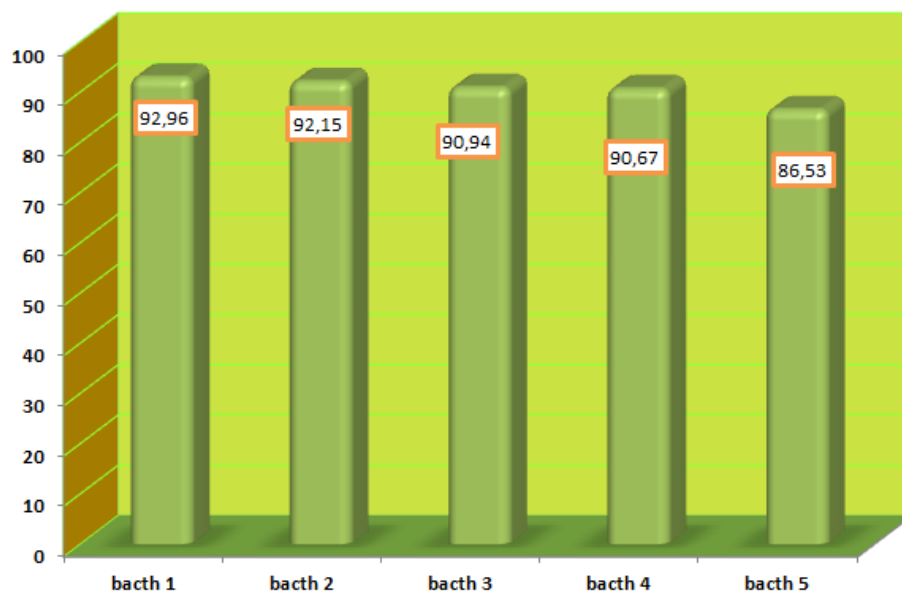
5.5. ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA.

Para evaluar la estabilidad de Lipozyme TL, IM se realizaron cinco reacciones consecutivas de alcoholisis en sistemas Batch. En la figura 11, se muestra la evolución de la conversión de la reacción con los reusos aplicados.

En las primeras seis (6) horas de reacción, la conversión se mantuvo por en los valores óptimos (figura 11), a partir de este tiempo empieza a disminuir pero de manera leve, hasta el quinto bach (15 horas) a partir del cual ya hay una disminución representativa de siete (7%) porciento respecto al valor de conversión inicial. Esta situación es considerada normal por los proveedores de

la enzima y por los que la han utilizado a escala industrial en otros procesos como la obtención de grasas especiales (Perea y col, 2005).

Figura 11. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL,IM en las condiciones, óptimas de reacción.



En trabajos realizados utilizando la misma enzima pero otros sustratos, se encuentran resultados similares en cuanto al tiempo de estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM (Amado y Rodríguez, 2007).

En el trabajo realizado por Wang y col, 2008, se lograron rendimientos del 86.2% y la enzima mantuvo un 70% de la actividad después de 10 batch. Dizge y Keskinler, 2008, muestran que después de 240 horas (decimo batch) de reacción se alcanzan rendimientos del 90%, en tanto que Hernández y Méndez, 2008, reportan que logran rendimientos del 92% después de 22.2 horas de reacción (sexto batch).

5.6 EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE JATROPHA CURCAS.

En la tabla 17, se presenta un resumen de las investigaciones más representativas desarrolladas en el área de biocombustibles en los últimos años, usando Lipozyme TL, IM como catalizador en la reacción de transesterificación de diferentes aceites vegetales, y en la tabla 18 se comparan investigaciones en las que fue usado el aceite de *Jatropha curcas* como fuente de triglicéridos en presencia de diferentes catalizadores. En todos los casos las condiciones de reacción fueron diferentes por lo cual para poder comparar se calculó la *productividad*, parámetro que relaciona la cantidad de ésteres alquílicos producidos respecto al tiempo de reacción, y la *productividad específica*, la cual adicionalmente considera la cantidad de catalizador

Al emplear la misma enzima pero diferentes sustratos la mayor productividad fue alcanzada por Rodríguez y Amado (2007) usando aceite de palmiste.

En cuanto a la productividad específica, los mayores valores son 3.6 y 3.0, que se logran en los trabajos de Rodríguez y Amado (2007), y Hernández y Mendez, (2008), seguida de la lograda en este trabajo que fue de 2.42. En los tres trabajos la relación de sustratos (aceite/etanol) es de 1:4, la diferencia radica en la cantidad de enzima; los trabajos antes mencionados utilizan una relación de enzima del 9%, mientras que en el presente estudio las condiciones óptimas arrojaron una relación del 12.36%. Los niveles de productividad alcanzados puede ser consecuencia de la utilización de etanol en lugar de metanol, en el cual, como se ha mencionado, tiene un fuerte efecto de inhibición sobre la enzima, dando lugar a bajas productividades.

De otra parte, en los trabajos realizados con la enzima Lipozyme TL IM (tabla 17) en sistemas discontinuos libres de solvente, la mayoría emplea una

temperatura de 40 °C, en un rango de agitación entre 100 – 200 rpm, las demás variables se repiten en algunos casos.

Tomando otro punto de comparación en la tabla 18 se ven los resultados de trabajos de transesterificación enzimática y química de aceite de *Jatropha c.* Se observa que los valores de productividad y productividad específica de este trabajo solo son excedidos por los estudios realizados con catalizadores químicos, dejando también expuesto que estos estudios utilizan una elevada temperatura. El trabajo de Tamalampudi (2008) utiliza la mitad de la cantidad de enzima que la reportada en este trabajo, las lipasas utilizadas fueron Rhizopus y Novozym 435, alcanzando niveles de conversión de etilésteres por debajo del 81%, además el tiempo de reacción supera las 20 veces el nuestro, teniendo una productividad con 1.33 y 0.84 respectivamente, que, comparada con este estudio, arroja una productividad de 29.95.

Con respecto a las propiedades de los ésteres alquílicos obtenidos a partir de aceite de *Jatropha c.* y etanol, algunos autores como Rodriguez (2007); Hernandez (2008), Jiang y col (2012), Ghasemi y Dehkordi (2014) que han reportado sus características, las encuentran dentro de los rangos establecidos por las especificaciones ASTM, lo cual los hace aptos para el uso como biodiesel en clima tropical y templado, con algunos inconvenientes que pueden superarse fácilmente haciendo mezclas con biodiesel de palma (Sarin, 2007).

Para terminar se puede establecer que la obtención de ésteres etílicos en un sistema discontinuo, usando como sustratos aceite de *Jatropha c.* y etanol en presencia de Lipozyme TL IM, posibilita llevarlo a una mayor escala, viéndose favorecido el desarrollo tecnológico y el aprovechamiento de la tierra donde es incultivable la palma.

Tabla 17. Transesterificación y comparación de las condiciones óptimas finales con trabajos que utilizan Lipozyme TL, IM

Variables	Este trabajo	Rodríguez (2007)	Hernández (2008)	Dizge (2008)	Khor (2010)	Jiang y col (2012)	Mata y col (2012)
Alcohol	Etanol	Etanol	Etanol	metanol	Metanol	metanol	Etanol
Aceite	Jatropha c.	Palmiste	Higuerilla	Canola	Palma	Jatropha	Maiz
Solvente	----	----	----	----	t- butanol	n-Hexano	----
Relación de sustratos (aceite/alcohol)	1:4	1:4	1:4	1:6		1:6	1:6
Agitación	Propela 200rpm	Propela 100 rpm	Propela 150 rpm	Shaker 180rpm	Shaker 150rpm	Shaker 180rpm	
Temperatura (°C)	59.875	40	53.4	40	40	45	35
Cantidad de enzima (% peso de aceite)	12.36	9	9	5	6.65	15	2.8
Tiempo de reacción (horas)	3.08	3	3.7	24	21.79	12	12
Rendimiento (% de ésteres)	92.26	97.8	97.48	90	98	90.6	69.2
Productividad*	29.95	32.6	26.3	3.9	4.49	7.55	5.76
Productividad específica**	2.42	3.6	3	0.78	0.67	0.50	2.06

*% de ésteres / hora

**% de ésteres / hora * cantidad de enzima

Tabla 18. Transesterificación de *Jatropha c.* utilizando diferentes tipos de catalizadores.

Variables	Este trabajo	Berchmans (2007)	Tamalampudi (2008)		Vyas (2009)	Jiang y col (2012)	Ghasemi y Dehkordi (2014)
Alcohol	Etanol	Metanol	Metanol		Metanol	Metanol	Metanol
catalizador	Liposyme, TL, IM	NaOH	Rhizopus	Novozym 435	KNO ₃ /Al ₂ O ₃	KOH- γ /Al ₂ O ₃	Liposyme TL, IM
Relación de sustratos (aceite/alcohol)	1:4	1:3	1:3		1:12	1:6	1:15
Agitación	Shaker 200rpm	Shaker 400 rpm	Shaker 150 rpm		Shaker 600 rpm	Shaker 180rpm	Shaker 180rpm
Temperatura (°C)	59.875	65	30		70	45	65
Cantidad de catalizador (% peso de aceite)	12.36	1.4	6	2	6	25	15
Tiempo de reacción (horas)	3.085	2	60	90	6	3	12
Rendimiento (% de ésteres)	92.26	90	80	76	84	76.35	90.6
Productividad*	29.89	30	1.33	0.84	14	25.45	7.55
Productividad específica**	2.41	21.42	0.22	0.42	2.33	1.02	0.50

*% de ésteres / hora

**% de ésteres / hora * cantidad de enzima

6. CONCLUSIONES

- La transesterificación enzimática de aceite de *Jatropha c* y etanol, utilizando la lipasa inmovilizada Lipozyme TL IM permite la obtención de ésteres etílicos en una proporción de 92% con una cantidad de enzima de 12.36% con respecto al peso del aceite, agitación de 200 rpm, temperatura de 59.9 °C, relación molar aceite etanol 1:4 y un tiempo de reacción de 3.08 horas.
- Los valores obtenidos en este trabajo para la productividad 29.89, y la productividad específica de 2.41, se encuentran dentro de los más altos reportados hasta el momento para la transesterificación enzimática del aceite de *Jatropha c*. usando etanol.
- La enzima Lipozyme TL IM, mantiene su estabilidad por encima del 90% hasta cuatro reusos, convirtiéndose la transesterificación enzimática en una alternativa tecnológica.
- La producción de etilesteres por transesterificación del aceite de *Jatropha c*. y etanol es amable con el medio ambiente ya que sus desechos son biodegradables.

7. RECOMENDACIONES

- Utilizar otro tipo de variables respuesta para el seguimiento de la reacción de alcoholisis, pues el alto costo de la cromatografía de gases de alta temperatura, HTGC limita el número de ensayos que se pueden realizar.
- Realizar estudios de costos a una mayor escala, para llevarlos a una producción real, pues se trata de una producción más limpia y que cumple con los principios de la química verde

BIBLIOGRAFÍA

- ACHTEN, W. M.J., et al. Jatropha bio - diesel production and use. Biomass and Bioenergy. Vol 32 (2008); p. 1063 – 1084
- ADBULKADIR, B., et al. In Situ Transesterification of Rubber Seeds (*Hevea brasiliensis*). Greener Journal of Physical Sciences. Vol 4 (2014) p. 38 – 44
- ADERIBIGBE, AO., et al. Chemical composition and effect of heat on organic matter - and nitrogen - degradability and some antinutritional components of Jatropha meal. Animal Feed Science and Technology. Vol 67 (1997); p. 223 – 243.
- AGARWAL, D., AGARWAL, A. K., et al. Performance and emissions characteristics of Jatropha oil (preheated and blends) in a direct injection compression ignition engine. Applied Thermal Engineering. Vol 27 (2007); p. 2314 - 2323
- AKINTAYO, E.T., characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. Bioresource Technology. Vol (2004); p. 307 - 310
- ANTCZAK, M. S., et al. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting of process. Renewale Energy. Vol 34 (2009); p. 1185 - 1194
- ANTCZAK, T., et al. Sugar ester synthesis by a mycelium - bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro - reactor equipped with water activity sensor. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol 29 (2004); p. 155 - 161.
- ARIAS, A. F., Los Biocombustibles en Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2006

- BANAPURMATH, N.R; et al. Performance and emission characteristics of a DI compression ignition engine operated on Honge, Jatropha an sesame oil methyl esteres. *Renowale Energy*. Vol 33 (2008); p. 1982 - 1988
- BEHNIA, M., et al. A Simple, Safe Method for Preparation of Biodiesel. *Journal of Chemical Education*. Vol 88 (2011) p. 1290 – 1292
- BERCHMANS, H. J., HIRATA, S., biodiesel production from crude Jatropha curcas L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Techonology*. Vol 99 (2008); 1716 - 1721.
- CARRASCO, J., et al. Efecto sobre la motilidad intestinal del extracto de alcaloides de semilla de Jatropha curcas L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol 18 (2013) p. 84 – 91
- CASTAÑO, A., ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE BODIESEL A PARTIR DE RESIDUOS GRASOS DE ORIGEN BOVINO. Pereira (Colombia). Facultad de Tecnología, Escuela de Química, Programa de Química Industrial. (2010).
- CASTRO, L. F., DÚRAN, O. J., Evaluación y Caracterización a Escala de los Procesos de Transesterificación para la Obtención de Metil Ester a Partir del Aceite de Palma., Trabajo de Grado (Ingeniería Química), Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química. (2006).
- DEMIRBAS, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel fom vegetable oils and fats. *Energy Convesion and Management*. Vol 49 (2008); p. 125 – 130

- DEVAPPA, R., et al. Nutritional, Biochemical, and Pharmaceutical Potential of Proteins and Peptides from Jatropha: Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 58 (2010) p.6543 – 6555
- DÍAZ, C. A., LÓPEZ, N. A.,. Diseño y Construcción de una Planta Piloto de Producción de Biodiesel de Manera Continua. Bucaramanga (Colombia), Trabajo de Grado (Ingeniería Mecánica). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas, Escuela de Ingeniería Mecánica. (2005)
- DÍAZ, L., BORGES, M. Low-Quality Vegetable Oils as Feedstock for Biodiesel Production Using K Pumice as Solid Catalyst. Tolerance of Water and Free Fatty Acids Contents. Journal of Food Chemistry. Vol 60 (2012) p.7928 – 7933
- DISHINGTON, J. Experiencia del Gremio Palmero Colombiano en el Desarrollo del Biodiésel de Palma. Taller IICA "Innovación Productiva en Circuitos Comerciales Orientados a la Producción y Comercialización de Biocombustibles" San José de Costa Rica, 2014.
- DIZGE, N., KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. Biomass and Bioenergy. Vol 32 (2008); p. 1274 - 1278.
- FEDEPALMA Localización geográfica de cultivos [en línea] citado 18 de diciembre de 2014, disponible en: <http://sispaweb.fedepalma.org/SitePages/areas.aspx>
- FEDEPALMA. Producción [en línea] citado 18 de diciembre de 2014, disponible en: <http://sispaweb.fedepalma.org/sitepages/produccion.aspx>

- FORSON, FK., et al. Performance of Jatropha oil blends in a diesel engine. *Renewable Energy*. Vol 29 (2004); p.1135 – 1145.
- GHASEMI, M., DEHKORDI, A., Tranesterification of Waste Cooking Oil to Biodiesel Using KOH/ γ - Al₂O₃ Catalyst in a New Two-Impinging-Jets Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. Vol 53 (2014) p. 12238 - 12248
- GOLDSTEIN, S. Biodiesel from Seeds: An Experiment for Organic Chemistry. *Journal of Chemical Education*. Vol 91 (2014) p.1693 -1696
- GUBITZ, GM. et al. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *BioresourceTechnology*. Vol 67 (1999); p. 73 – 82.
- HERNÁNDEZ, S. M., MÉNDEZ, D. E., Transesterificación enzimática del aceite de higuerilla usando lipasa inmovilizada de *Thermomyces Lanuginosus*. Bucaramanga (Colombia), Trabajo de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. (2008)
- HINCAPIÉ, G., et al. Effect of Microwave-Assisted System on Transesterification of Castor Oil with Ethanol. *Universitas Scientiarum*. Vol 19 (2014) p. 193 - 200
- JOSHI, G., et al. Evaluation of Additive Effects on Oxidation Stability of *Jatropha curcas* Biodiesel Blens with Conventional Diesel Sold at Retail Outlests. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. Vol 52 (2013) p. 7586 - 7592
- KUMAR, A., SHARMA, S., An Evaluation of Mulpurpose Oil Seed Crop for Industrial Uses (*Jatropha curcas* L)., *Industrial Crops and Products XXI* (2008).

- KUMAR, S., et al. Densities and Speeds of Sound of Jatropha curcas Biodiesel + (C4–C5) Alkan-1-ol Binary Mixtures. Journal of Chemical and Engineering. Vol 57 (2012) p. 2236 - 2242
- KUMARI, A., et al. Enzymatic transesterification of Jatropha oil. Biotechnology for Biofuels. Research (2009); p. 1 - 7.
- LEUNG, DYC., GUO, Y. transesterification of neat and use frying oil: Optimization for biodiesel production. Fuel Process Technology. Vol 87 (2006); p. 883 - 890.
- LIANG, K., et al. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Lipid from Microalgae. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 60 (2012) p. 11771 - 11776
- LU, H., et al. Production of biodiesel from Jatropha curcas L. oil. Computers and Chemical Engineering. Vol 33 (2009); p. 1091 - 1096
- MA, F., HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. Vol 70 (1999); p. 1 - 15.
- MATA, T., et al. Biodiesel Production from Corn Oil via Enzymatic Catalysis with Ethanol. Energy Fuels. Vol 26 (2012) p. 3034 – 3041
- MEDINA, I., GRECO, K.,(2012). Obtención y Caracterización de Biodiesel a Partir de Aceite de Semillas de Ricinus communis. (HIGUERILLA) Modificadas Genéticamente y Cultivadas en el eje Cafetero. Pereira (Colombia). Facultad de Tecnología, Escuela de Química, Programa de Química Industrial.
- MESA, R., www.fedepalma.org Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite. Oferta y consumo aparente. Tabla 23: Importaciones de

productos de la agroindustria de la palma de aceite. Sección 2.5. Anuario Estadístico 2014

- MIZE, H., et al. Emulsions of Crude Glycerin from Biodiesel Processing with Fuel Oil for Industrial Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 61 (2013) p.1319 – 1327
- MONTERO, A. R.,(2003). Estudio de la Transesterificación de Aceite Vegetal con Metanol. Madrid (España). Trabajo de Grado (Ingeniería Química). Universidad Rey Juan Carlos. Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología.
- NELSON, LA., et al. Lipase - catalyzed production of biodiesel. *J AmOil Chem Soc*. Vol 73 (1996); p. 1191 - 1195.
- NOEREDDINI, H., et al. Immobilized *Pseudomonas cepia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*. Vol 96 (2005); p. 769 - 777.
- PABÓN, L., RODRÍGUEZ, P., Importancia Química de *Jatropha curcas* y sus Aplicaciones Biológicas, Farmacológicas e industriales. *Revista Cubana de Química*. Vol 17 (2012); p. 205 - 211
- PEREA, J., et al. Desarrollo de grasas especiales a escala de planta piloto a partir del Aceite de Palma. *Proyecto colciencias* (2005).
- PHANKOSOL, S., et al. Estimation of Density of Biodiesel. *Energy & Fuels*. Vol 28 (2014) p. 4633 - 4641
- PRAMANIK, K. properties and use of *jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renewable Energy*. Vol 28 (2003); p. 239 - 248.

- PRUEKSAKORN, K.,GHEEWALA, S., Biodiesel from *Jatropha curcas* L. in Thailand. *Environ.Sci. Technol.* Vol 42 (2008); p. 3388 -3393.
- RAMADHAS, A. S., et al. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel.* Vol 84 (2005); p. 335 - 340.
- RANADE, A., et al. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single - primer amplication reacion (SPAR) ,methods. *Biomass and Bioenergy.* Vol 32 (2008); p. 533 – 540
- RATHORE, V., et al. Glycerin-Free Synthesis of *Jatropha* and *Pongamia* Biodiesel in Supercritical Dimethyl and Diethyl Carbonate. *Industrial & Engineering Chemistry Research.* Vol 53 (2014) p. 10525 – 10533
- RODRIGUEZ, E., AMADO, M. A.,(2006). Estudio de la Obtención de Esteres Etilicos por Transesterificación Usando Lipasa Inmovilizada de *Thermomyces lanoginosus.*,Bucaramanga(Colombia), Trabajo de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
- SAMMAIAH, A.,et al. Synthesis and Evaluation of Novel Acyl Derivatives from *Jatropha* Oil as Potential Lubricant Basestocks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol 62 (2014) p.4652- 4660
- SARIN, R., et al. *Jatropha* - Palm biodiesel blends: An otimum mix for Asia. *Fuel.* Vol 86 (2007); p. 1365 - 1371.
- SCHUCHARDTA, U., et al. Transesterification of vegeable oil: a Review. *J Braz. Chem. Soc.* Vol 9, No. 1 (1998); p. 199 - 210.

- SERIO, M. D., et al. Synthesis of biodiesel via homogeneous Lewis acid catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* vol 239 (2005); p. 111 - 115.
- SHAH, S., GUPTA, M.N., lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*. Vol 42 (2007); p.409 - 414.
- SHARMA, Y. C. SINGH, B. Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India. *Fuel*. 2007.
- SHARMA, Y. C., et al. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*. Vol 87 (2008); p. 2355 - 2373.
- SHIEH, C. J., et al. Optimizacion of lipase - catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*. Vol 88 (2003); p. 103 - 106.
- SINGH, D., et al. Synthesis of Biodiesel from Vegetable Oil Using Supported Metal Oxide Catalysts. *Energy Fuels*. Vol 28 (2014) p. 2743 - 2753
- SINGH, R. N., et al . SPRERI Experienci on Holistic Approach to Utilize all Parts of *Jatropha curcas* Fruit for Energy. *Renewable Energy*. Vol 33 (2008); p. 1868-1873.
- SKOOG, D. A., et al. *Principios de análisis instrumental*. Mc graw hill. España. 2001.
- SU, E., WEI, D. Production of Fatty Acid Butyl Esters Using the Low Cost Naturally Immobilized *Carica papaya* Lipase. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. Vol 62 (2014) p. 6375 – 6381

- TAMALAMPUDI, S., et al. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized – whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 39 (2008); p. 185 - 189.
- TEWARI, DN., *Jatropha and biodiesel*. 1st ed. NewDelhi: Ocean Books Ltd; 2007.
- TIWARI, A. K., et al. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 31 (2007); p. 569 - 575
- VYAS, A. P., et al. Production of biodiesel through transesterification of Jatropha oil using KNO₃/Al₂O₃ solid catalyst. *Fuel*. Vol 88 (2009); p. 625 - 628.
- WANG, Y. et al. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM - catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technology*. Vol 99 (2008); p. 7232 - 7237.
- WU, S. The extraordinary collapse of Jatropha as a Global Biofuel. *Environmental Science & Technology*. Vol 45 (2011);p. 7114 -7115
- XIAO, J., et al. Evaluation of Detoxificaciion Methods on Toxic and Antinutritional Composition and Nutritional Quality of Proteins in *Jatropha curcas* Mal. *Journal of Agricultural and Food Chemmistry*. Vol 59 (2011);p. 4040 -4044
- XIE, W., WANG, J. Enzymatic Production of Biodiesel from Soybean Oil by Using Immobilized Lipase on Fe₃O₄/Poly(styrene-methacrylic acid) Magnetic Microsphere as a Biocatalyst. *Energy Fuels*. Vol 28 (2014) p. 2624 - 2631

- XU, H., et al. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella portothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*. Vol 126 (2006); p. 499 - 500.
- YANG, M., et al. Proteomic Analysis of Oil Mobilization in Seed Germination and Postgermination Development of *Jatropha curcas*. *Journal of Proteome Research*. Vol 8 (2009) p.1441 – 1451
- ZHANG, J., et al. Variables Affecting Biodiesel Productio From *Zanthoxylum bungeanum* Seed Oil with High Free Fatty Acids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. Vol 51 (2012) p. 3525 - 3530

ANEXOS

Anexo A. perfil cromatográfico del producto de la relación de alcoholisis en condiciones óptimas (92.26 etilésteres)

