

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL  
MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS  
SINTÉTICO EN MEDIO BÁSICO (KOH) CON METANOL**

**ÉLVER DAVID GAMBOA DUARTE  
ENMANUEL SNÉYDER CELIS CASTELLANOS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL  
MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS  
SINTÉTICO EN MEDIO BÁSICO (KOH) CON METANOL**

**ÉLVER DAVID GAMBOA DUARTE  
ENMANUEL SNÉYDER CELIS CASTELLANOS**

**Trabajo de grado para optar al título de  
INGENIERO QUÍMICO**

**Director  
VIATCHESLAV V. KAFAROV  
Ingeniero Químico Ph.D.**

**Codirectores:  
Ing. ERIKA GUZMÁN  
Ing. VLADIMIR PLATA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

## DEDICATORIA

A Dios quien me ha guiado, me ha dado fortaleza y sabiduría para sacar adelante mi carrera, por ser mi sustento y protector.

A mis padres que siempre han estado acompañándome, por su amor y dedicación.

A toda mi familia por la confianza y el afecto que me han demostrado, por su compañía e incondicional apoyo.

A aquella amiga que con su cariño me fortaleció y me hizo una mejor persona.

*Élver*

## DEDICATORIA

A Dios que me ha acompañado y me ha sostenido con su diestra en cada momento, que ha sido fiel y siempre ha conservado su mirada en los propósitos que ha soñado para mí, que me ha dado las fuerzas para seguir paso a paso en el proyecto que Él ha escrito para mi vida, y del cual este trabajo ha hecho parte.

A mi madre que ha sembrado con mucho amor, que por cada sueño ha dedicado un gran sacrificio, y que a pesar de la distancia, su amor y su entrega por su familia me hace saber que está más cerca.

A mi padre que también soñó con esto, él hubiera deseado leer esta página y compartir este éxito conmigo, y que aunque ya no esté le agradezco de corazón todo lo que influyó en mi vida, le llevo en el alma.

A toda mi familia por la ayuda incondicional durante todos estos años, por creer en la semilla que Dios plantó en buena tierra, y a Sergio, un hermano que brindó un gran apoyo para mi vida, gracias por cada respuesta.

Y a ella, que fue motivo para esforzarme durante este trayecto y que de la sencillez y el cariño de su corazón pude aprender una enseñanza de lo que realmente vale la pena para toda la vida.

*Enmanuel*

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, por la formación profesional suministrada, por los valores morales y éticos inculcados, por ser gestora del alcance de las metas que involucran la búsqueda de una sociedad de desarrollo.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, por el programa nacional de desarrollo tecnológico para la producción de biodiesel a partir de microalgas, el cual ha suministrado la base de investigación de este trabajo.

VIATCHESLAV KAFAROV, Ingeniero Químico Ph.D. Profesor de la Escuela de Ingeniería Química y Director de Proyecto de grado, por su gestión durante el desarrollo del proyecto.

VLADIMIR PLATA, Ingeniero Químico, por su orientación y colaboración.

A la Doctora ELENA STANCHENKO y a la Doctora AIDÉ PEREA por su asesoría.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biomasa de la Escuela de Ingeniería Química, por su compañía y colaboración

GUILLERMO ACERO, ADOLFO SANCHEZ, EDUARDO CARREÑO y WILSON CARREÑO, Laboratorio de Procesos de la Escuela de Ingeniería Química, por la ayuda suministrada.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 BIODIESEL	3
1.2 MATERIA PRIMA	3
1.2.1 Aceite sintético	4
1.3 REACTIVOS	4
1.3.1 Hidróxido de potasio (KOH)	4
1.3.2 Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	4
1.4 PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN	5
2. PARTE EXPERIMENTAL	8
2.1 DISEÑO FACTORIAL DE EXPERIMENTOS	9
2.1.1 Cálculo de los efectos principales	9
2.2 ACEITE SINTÉTICO	
2.3 MONTAJE Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	10
2.4 METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO	14
2.4.1 Densidad	14

2.4.2	Viscosidad	14
2.4.3	Índice de refracción	15
2.4.4	Espectroscopia infrarrojo	15
2.4.5	Punto de nube	16
2.4.6	Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)	16
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	17
3.1	RESULTADOS Y OBSERVACIONES DE LOS EXPERIMENTOS	17
3.2	CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO	18
4.	CONCLUSIONES	26
5.	RECOMENDACIONES	28
	BIBLIOGRAFÍA	29
	ANEXOS	32

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Reacción global de transesterificación de aceite a biodiesel	6
Figura 2. Secuencia de reacciones reversibles para la formación de metilésteres y glicerol	6
Figura 3. Mecanismo de reacción en la transesterificación de triglicéridos	7
Figura 4. Proceso de producción de biodiesel	11
Figura 5. Montaje experimental para la producción de biodiesel a partir de aceite sintético de <i>Chlorella Vulgaris</i>	12
Figura 6. Separación de las fases obtenidas después de la reacción de transesterificación.	13
Figura 7. Neutralización de la fase liviana con agua destilada	14
Figura 8. Viscosidades obtenidas a las diferentes condiciones de temperatura, relación molar y concentración de catalizador	20
Figura 9. Temperaturas de punto de nube obtenidas a las diferentes condiciones de temperatura, relación molar y concentración de catalizador	21

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Proporción másica de 1 kg de aceite sintético de <i>Chlorella Vulgaris</i>	8
Tabla 2. Matriz de experimentos (KOH y CH <sub>3</sub> OH)	10
Tabla 3. Matriz de diseño experimental en unidades originales y codificadas de las variables	10
Tabla 4. Cantidad obtenida de productos.	18
Tabla 5. Resultados de pruebas de caracterización.	19
Tabla 6. Norma ASTM ( <i>American Society for Testing and Materials</i> ) de máximos valores permitidos para biodiesel.	19
Tabla 7. Resultados de caracterización por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)	22
Tabla 8. Medida individual del cambio de relación molar CH <sub>3</sub> OH/aceite	23
Tabla 9. Medida individual del cambio de cantidad de catalizador	23
Tabla 10. Medida individual del cambio en la temperatura de reacción	23
Tabla 11. Efecto de la interacción entre la relación molar y la temperatura	24
Tabla 12. Efecto de la interacción entre la relación molar y la cantidad de catalizador	24
Tabla 13. Efecto de la interacción entre la cantidad de catalizador y la temperatura	24
Tabla 14. Resumen de efectos individuales e interacciones encontradas	25

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Metodología para la preparación de aceite sintético de <i>Chlorella Vulgaris</i> a partir de aceites vegetales.	34
ANEXO B. Determinación cuantitativa de ácidos grasos para la elaboración del aceite sintético de <i>Chlorella Vulgaris</i> según normas ISO 5508 e ISO 5509	36
ANEXO C. PLAN DE TRABAJO EXPERIMENTAL. Determinación del peso molecular de una mezcla de aceites.	40
ANEXO D. Resultados de espectroscopía infrarroja característica de cada prueba.	46

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS SINTÉTICO EN MEDIO BÁSICO (KOH) CON METANOL\*

**AUTORES:** ÉLVER DAVID GAMBOA DUARTE, ENMANUEL SNÉYDER CELIS CASTELLANOS\*\*

**PALABRAS CLAVES:** MICROALGAS, TRANSESTERIFICACIÓN, BIODIESEL, CHLORELLA VULGARIS.

### DESCRIPCIÓN:

Estudio realizado para la producción de biodiesel a partir de una mezcla de aceites refinados de origen vegetal, la cual fue formulada en base al perfil de ácidos grasos reportado en la literatura para el aceite de la especie de microalga *Chlorella Vulgaris*. En este trabajo se determinó la influencia sobre las características del producto a obtener y sobre el rendimiento del proceso de transesterificación por metanólisis básica, de acuerdo a la cantidad de catalizador, temperatura de reacción y relación molar metanol/aceite.

Las pruebas se llevaron a cabo en un reactor batch de 2000 mL equipado con un sistema de agitación electromagnético operando a 400 rpm durante una hora y utilizando hidróxido de potasio (KOH) como catalizador. Con el fin de evaluar el efecto de las variables de operación se empleó un diseño factorial  $2^3$ , en el cual los niveles del dominio experimental correspondieron a concentraciones de 0.75% y 1.5% p/p de catalizador basado en el peso del aceite, relación molar metanol/aceite de 6:1 y 12:1 y temperaturas de operación de 45°C y 64 °C.

Las muestras del producto obtenido fueron analizadas mediante pruebas de cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (HPLC), densidad, viscosidad, índice de refracción, punto de nube y espectroscopía infrarroja.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la interacción de mayor grado de incidencia sobre el proceso ocurre al variar la concentración de catalizador junto con la relación molar metanol/aceite. Además al trabajar con un nivel alto de concentración de catalizador KOH (1,5 p/p) y de relación molar metanol/aceite (12:1), se obtiene mayor cantidad de glicerina y biodiesel de menor viscosidad dentro de los límites máximos permitidos en la norma ASTM D6751 y con mayor contenido de metilésteres (% FAME > 98%).

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D Viatcheslav V. Kafarov. Codirectores: Ing. Erika Guzmán, Ing. Vladimir Plata

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE PROCESS FOR BIODIESEL PRODUCTION BY ALKALINE-CATALYZED TRANSESTERIFICATION (KOH-METHANOL) OF SYNTHETIC MICROALGAE OIL.\*

**AUTHORS:** ÉLVER DAVID GAMBOA DUARTE, ENMANUEL SNÉYDER CELIS CASTELLANOS\*\*

**KEYS WORDS:** MICROALGAE, TRANSESTERIFICATION, BIODIESEL, CHLORELLA VULGARIS.

### DESCRIPTION:

Study for the production of biodiesel from a blend of refined vegetable oils, which was formulated on the basis of the fatty acid profile reported in the literature for the oil of the microalgae species *Chlorella Vulgaris*. The influence on the product characteristics and on the yield of transesterificación process by alkaline-catalyzed methanolysis was determined, according to the amount of catalyst, reaction temperature and methanol/oil molar ratio.

The tests were carried out in a 2000 mL batch reactor equipped with an electromagnetic stirring system, operating at 400 rpm for an hour and using potassium hydroxide (KOH) as catalyst. A 2<sup>3</sup> factorial design was used to evaluate the effect of design variables, where the experimental domain levels corresponded to catalyst concentrations of 0.75% and 1.5% w/w oil weight basis, molar ratio methanol/oil of 6:1 and 12:1 and reaction temperatures of 45°C and 64°C.

The samples of the product were analyzed by gas chromatography (GC), liquid chromatography (HPLC), density, viscosity, refractive index, cloud point and infrared spectroscopy.

From obtained results, the most significant interaction at the process occurs when catalyst concentration and molar relation methanol/oil vary together. Moreover, largest quantity of glycerine and a low viscosity biodiesel in conformity to the Standard Biodiesel max bounds (ASTM D6751) with the largest content of metilésteres (% FAME > 98 %), are produced using the high level of KOH concentration (1,5% w/w) and the high level of molar relation methanol/oil (12:1).

---

\* Graduation project

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D Viatcheslav V. Kafarov. Codirectors: Erika Guzmán, Vladimir Plata

## INTRODUCCIÓN

El precio de los combustibles derivados del petróleo se ha elevado en los últimos años y las reservas disponibles de este importante combustible se agotarán en poco tiempo de acuerdo a la actual creciente tasa de consumo. Por otro lado, estos combustibles no renovables también emiten polutantes durante su procesamiento y uso en forma de óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, dióxido de carbono, monóxido de carbono, plomo, hidrocarburos, etc., generando una mayor preocupación en relación al calentamiento global.

Por tanto, la investigación está siendo dirigida ahora hacia la búsqueda de fuentes de combustibles renovables alternativos y amigables con el ambiente que sean capaces de satisfacer una demanda creciente de energía a la luz de una naturaleza limitada de combustibles. Ante tal necesidad, el biodiesel aparece como una respuesta libre de azufre, no tóxico, biodegradable, y que además presenta propiedades físicas similares a las del diesel convencional, y algunas de ellas aún mejores tales como un alto número de cetano, ausencia de aromáticos, y más del 10% en peso de oxígeno, lo cual reduce las emisiones de gases de invernadero <sup>[1]</sup>. Sin embargo, a pesar del impacto favorable que su comercialización podría proveer, los aspectos económicos de la producción de biodiesel previenen su desarrollo y uso a gran escala, principalmente debido al alto costo de aceites vegetales, y además, el biodiesel producido a partir de cultivos agrícolas usando los métodos existentes no puede reemplazar sosteniblemente los combustibles fósiles, dado que compromete la seguridad del mercado de alimentos <sup>[1,3]</sup>.

Por otra parte, las microalgas han sido propuestas como muy buenas candidatas para la producción de combustibles debido a sus ventajas de alta eficiencia fotosintética, alta producción de biomasa y rápido crecimiento comparado con

otros cultivos energéticos. Las microalgas son organismos fotosintéticos que tienen la capacidad de convertir el dióxido de carbono en azúcares, proteínas y algunos metabolitos tales como lípidos, que consecuentemente serán aprovechados para la producción de biocombustibles renovables de gran potencial como metano producido a partir de la digestión anaeróbica de su biomasa, biohidrógeno producido fotobiológicamente, y especialmente biodiesel derivado del aceite de microalgas.

Dependiendo de la especie, no todos los aceites de algas son apropiados para la elaboración de biodiesel <sup>[3]</sup>. Ante esto, se ha identificado una especie en particular, *Chlorella Vulgaris*, de la cual se ha obtenido información de los principales ácidos grasos presentes en su aceite que ha permitido la formulación de una mezcla de aceites de origen vegetal y composición conocida para generar una materia prima con características aproximadas al aceite de estudio. De este modo se ha logrado desarrollar este estudio preliminar dirigido a la identificación de variables de operación que ofrezcan resultados satisfactorios en un producto que cumpla con los estándares y especificaciones requeridos, lo cual podrá tomarse como punto de partida para generar directrices hacia trabajos posteriores con microorganismos nativos.

Este trabajo fue desarrollado gracias a la política nacional de biocombustibles que viene fomentando el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a través de programas que buscan promover la producción sostenible de biocombustibles en Colombia, con el objeto de mejorar su productividad y evaluar la eficiencia de diferentes materias primas alternativas.

## 1. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se describen aspectos generales del biodiesel, así como también de la materia prima a partir de la cual se puede obtener, del aceite sintético de la especie de microalga de estudio *Chlorella Vulgaris*, de los reactivos usados durante la reacción y del proceso de transesterificación.

### 1.1 BIODIESEL

De acuerdo con la norma internacional ASTM (*American Society for Testing and Materials*) químicamente el biodiesel está formado por monoalquilésteres de ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de materias primas renovables como aceites vegetales y grasas de origen animal, y que se emplea en los motores de ignición de compresión (motores diesel) o en calderas de calefacción. Comúnmente el biodiesel es producido mediante el proceso de transesterificación, en donde un aceite o grasa reacciona con un alcohol en presencia de un catalizador <sup>[4]</sup>.

### 1.2 MATERIA PRIMA

Bajo el marco de la política de investigación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en el campo de los biocombustibles, se busca evaluar la eficiencia de diferentes materias primas alternativas. Por eso se ha creado un programa de desarrollo tecnológico para la producción de biodiesel a partir de microalgas, del cual hace parte el proyecto de bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel en el cual se encuentran trabajando en conjunto el Instituto Colombiano del Petróleo, la Universidad Industrial de Santander y la Corporación Instituto de Morrosquillo, la cual adelanta labores en la búsqueda de una especie de microalga que ofrezca un alto contenido de lípidos para favorecer el rendimiento en la producción de biodiesel <sup>[5]</sup>. Sin embargo, dado que no se ha encontrado una especie de microalga que pueda asegurar

resultados promisorios, se ha optado por el desarrollo de un aceite sintético con un perfil lipídico similar al presente en el aceite de una especie de microalga en particular, *Chlorella Vulgaris*, y así poder evaluar los alcances que puede tener un producto obtenido a partir de esta fuente alternativa.

**1.2.1 Aceite sintético.** Consiste en una mezcla formulada de aceites refinados de origen vegetal, seleccionados por su aporte de ácidos grasos saturados e insaturados en la obtención de un perfil lipídico similar al presente en el aceite de *Chlorella Vulgaris*.

### 1.3 REACTIVOS

**1.3.1 Hidróxido de potasio (KOH).** Es un producto de bajo costo y de amplia disponibilidad. Sin embargo, debido a su mayor peso molecular, puede requerirse mayor cantidad de KOH en el proceso de transesterificación a comparación de otros catalizadores alcalinos de amplio uso como el hidróxido de sodio (NaOH), lo cual puede elevar los costos de producción de biodiesel. No obstante, durante la separación de los productos finales del glicerol, el uso de KOH resulta ser más conveniente, pues los jabones de potasio son más suaves que los jabones de sodio y no bloquean el fondo del embudo de decantación y son removidos fácilmente. Por tanto, el KOH es preferido como catalizador sobre el NaOH en aplicaciones de nivel industrial <sup>[2]</sup>. El KOH se disuelve con mayor facilidad que el NaOH en el metanol, lo cual facilita el primer paso previo a la transesterificación. Por otra parte, las sales de potasio obtenidas como subproducto de la purificación de la glicerina pueden ser utilizadas como fertilizante agrícola <sup>[6,7]</sup>.

**1.3.2 Metanol (CH<sub>3</sub>OH).** Los alcoholes que comúnmente se utilizan para la producción de biodiesel son el metanol y el etanol, aunque se pueden utilizar otros alcoholes tales como propanol, isopropanol, butanol y pentanol, pero estos son

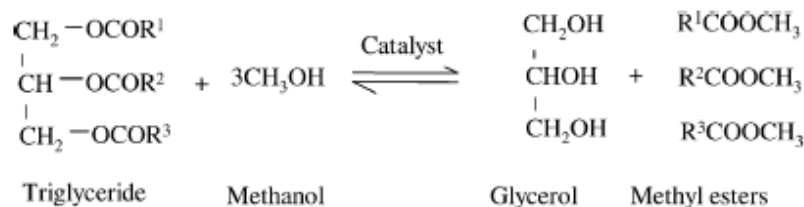
mucho más sensibles a la contaminación con agua (la presencia de agua en mínimas cantidades inhibe la reacción). El uso de etanol en el proceso de transesterificación presenta la desventaja de ser menos reactivo que el metanol, y por tanto la reacción se ve afectada principalmente por la presencia de agua en los reactivos. Se requiere entonces que el etanol a utilizar sea de alta pureza, y que los otros insumos (aceite y catalizador) sean igualmente puros. Es por esto que en la mayoría de plantas de producción de biodiesel aún se utiliza metanol pese a su toxicidad <sup>[6]</sup>.

Sin embargo, se ha reportado que la producción de biodiesel es independiente del tipo de alcohol usado y la selección de uno de estos depende básicamente del costo y desempeño. Ante esto, el metanol es preferido sobre los demás debido a su bajo costo <sup>[8]</sup>, y una suficiente cantidad del mismo durante la transesterificación es esencial para romper los enlaces de glicerina-ácidos grasos. Sin embargo, un exceso de metanol que incremente la relación molar metanol/aceite puede hacer complicado el proceso de recuperación de ésteres y aumenta los costos de operación <sup>[2]</sup>.

#### **1.4 PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN**

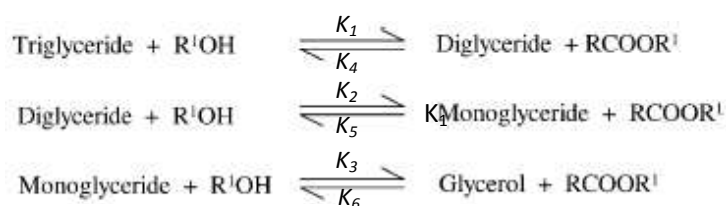
La transesterificación o alcoholólisis es el desplazamiento o sustitución del alcohol trihidroxilado del acilglicérido por otro de baja masa molecular como se muestra en la Figura 1, en un proceso similar a la hidrólisis, solo que es utilizado un alcohol en vez de agua <sup>[22]</sup>. El alcohol actúa como agente nucleofílico (par de electrones libres sobre el átomo de oxígeno) sobre el carbono carbonílico deficiente de electrones dado el efecto sustractor que ejerce el oxígeno unido directamente a éste. La transesterificación puede ocurrir en medio ácido o básico y los mecanismos son equivalentes a los de hidrólisis. Este proceso es ampliamente utilizado en la disminución de la viscosidad de los triglicéridos <sup>[2]</sup>.

Figura 1. Reacción global de transesterificación de aceite a biodiesel



La transesterificación de triglicéridos produce alquilésteres de ácidos grasos y glicerol, el cual se deposita en el fondo del reactor. Los diglicéridos y monoglicéridos vienen a ser productos intermedios en un proceso de tres reacciones secuenciales en las que se obtiene un mol de éster metílico en cada conversión hasta obtener la glicerina final. En el primer paso, los triglicéridos son convertidos a diglicéridos los cuales son convertidos luego a monoglicéridos en el próximo paso. En la tercera y última etapa, los monoglicéridos son convertidos en glicerol. Por tanto se obtienen tres ésteres a partir de una molécula de triglicérido, lo cual se ilustra en la Figura 2 [2].

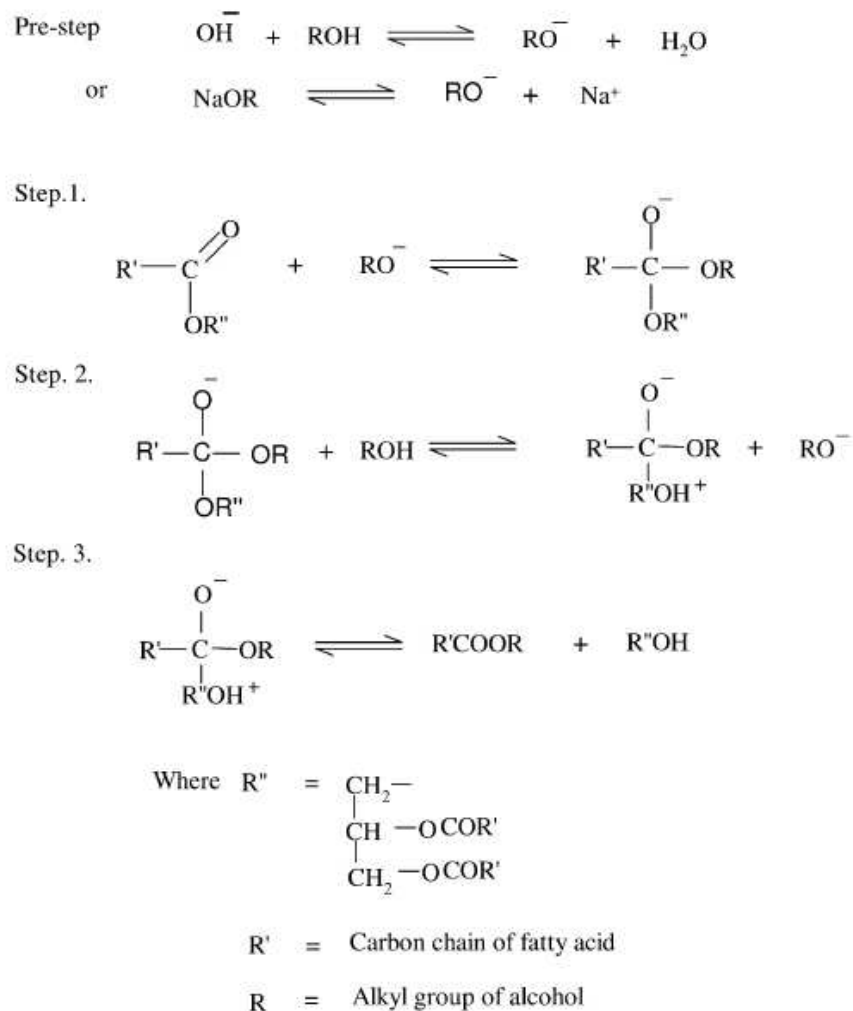
Figura 2. Secuencia de reacciones reversibles para la formación de metilésteres y glicerol



Las reacciones sucesivas son reversibles y un poco de exceso de alcohol es usado para desplazar el equilibrio hacia la formación de ésteres. En presencia de un exceso de alcohol, la reacción preliminar es de pseudo-primer orden y la reacción inversa es de segundo orden. Se han encontrado los valores de las constantes de velocidad de reacción  $K_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$ , respectivamente 5.00, 4.93 y

29.67 dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y los valores para las reacciones inversas  $K_4$ ,  $K_5$  y  $K_6$ , son 3.54, 2.99 y 0.79 dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> [9]. El primer paso implica el ataque del ión alcóxido contra el carbono del grupo carbonilo de la molécula del triglicérido, lo que conlleva a la formación de un intermedio tetraedral. La reacción de esta especie intermedia con un alcohol produce el ión alcóxido en la segunda etapa. En la última fase el reacomodo del intermedio tetraedral da lugar a un éster y a un diglicérido (Ver Figura 3)<sup>[10]</sup>.

Figura 3. Mecanismo de reacción en la transesterificación de triglicéridos



## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Para la obtención de la materia prima a utilizar en el desarrollo de los experimentos, se determinó la proporción másica de una mezcla de aceites de linaza, de girasol, de oliva y de superestearina de palma, que de acuerdo a las composiciones conocidas de los aceites vegetales a usar, ofreciera un perfil de ácidos grasos de composición aproximada al aceite de *Chlorella Vulgaris* (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Proporción másica de 1 kg de aceite sintético de *Chlorella Vulgaris*

Componente de la mezcla	Masa (g)
Aceite de linaza	732.0
Aceite de girasol	241.0
Aceite de oliva	8.8
Superestearina de palma	22.0

Las cantidades reportadas anteriormente corresponden a la convergencia de un modelo matemático basado en el desarrollo de una metodología para la preparación de una mezcla de aceites vegetales de composición conocida, simulando el aceite de *Chlorella Vulgaris*, la cual fue desarrollada y presentada públicamente en el IV Simposio de Química Aplicada SIQUIA 2009, llevado a cabo en la ciudad de Armenia, Colombia (Anexo A) <sup>[21]</sup>. La determinación cuantitativa de ácidos grasos de los diferentes aceites a emplear en la elaboración del aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* aparece relacionada en el Anexo B.

De acuerdo a pruebas preliminares de índice de acidez efectuadas en el aceite sintético que se obtuvo (Método Oficial AOCS Ca 5a-40, Ver Anexo C), el uso de catalizadores básicos en el proceso de transesterificación es acertado. Se encontró un índice de acidez de 0.233 mg de KOH/g aceite, el cual permite considerar que el uso de catalizadores alcalinos no aportará significativamente a la

formación de jabones o emulsiones no deseadas, gracias al bajo contenido de ácidos grasos libres en el aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* <sup>[2,12]</sup>.

## **2.1 DISEÑO FACTORIAL DE EXPERIMENTOS.**

El desarrollo de un diseño factorial de experimentos permite obtener una estimación del efecto de una única variable a condiciones seleccionadas mientras se mantienen fijas las demás. Sin embargo, para que esta estimación sea general hay que suponer que ese efecto será el mismo en los otros niveles de las demás variables y que en la zona de interés los efectos son aditivos. El factorial también puede identificar las interacciones de mayor aporte sobre la respuesta evaluada en el estudio experimental <sup>[11]</sup>.

Para desarrollo del estudio se aplicó un diseño factorial de dos niveles, con el fin de analizar el efecto de tres variables sobre la reacción de transesterificación catalizada con el metóxido de potasio. Debido a la limitada disponibilidad de recursos la evaluación de las condiciones experimentales se condujo sin réplicas. Se analizó el efecto individual del cambio en la relación molar metanol/aceite (A), cantidad de catalizador (B), y temperatura de reacción (C). La respuesta evaluada fue la cantidad de metilésteres de ácido grasos (FAME's) formados durante la reacción. También se estudió el efecto de la interacción entre estas tres variables sobre la reacción de transesterificación, para lo cual se evaluó la misma respuesta. Las Tablas 2 y 3 muestran la matriz de diseño obtenida para el desarrollo de las pruebas.

**2.1.1 Cálculo de los efectos principales.** El cambio en la respuesta al pasar del nivel bajo (-) al nivel alto (+) del factor analizado se identifica como 'efecto', que para el caso de la relación molar (A), permitiría determinar el 'efecto principal de la relación molar' A, el cual mide el efecto medio de dicha variable a todas las condiciones de las demás variables.

Tabla 2. Matriz de experimentos (KOH y CH<sub>3</sub>OH)

Variables de diseño	Dominio experimental	
	Nivel (-)	Nivel (+)
<b>X1: Relación molar CH<sub>3</sub>OH-aceite</b>	6:1	12:1
<b>X2: Temperatura de reacción</b>	45°C	64°C
<b>X3: Cantidad de catalizador (KOH)</b>	0,7% w/w	1,5% w/w

Tabla 3. Matriz de diseño experimental en unidades originales y codificadas de las variables

Prueba (i)	Condición			Respuesta % FAMEs encontrados (Y <sub>i</sub> )
	Relación molar CH <sub>3</sub> OH:aceite	Cantidad de KOH (w/w)	Temperatura (°C)	
<b>1</b>	6:1 (-)	0,7 (-)	45 (-)	<b>Y<sub>1</sub></b>
<b>2</b>	12:1 (+)	0,7 (-)	45 (-)	<b>Y<sub>2</sub></b>
<b>3</b>	6:1 (-)	1,5 (+)	45 (-)	<b>Y<sub>3</sub></b>
<b>4</b>	12:1 (+)	1,5 (+)	45 (-)	<b>Y<sub>4</sub></b>
<b>5</b>	6:1 (-)	0,7 (-)	64 (+)	<b>Y<sub>5</sub></b>
<b>6</b>	12:1 (+)	0,7 (-)	64 (+)	<b>Y<sub>6</sub></b>
<b>7</b>	6:1 (-)	1,5 (+)	64 (+)	<b>Y<sub>7</sub></b>
<b>8</b>	12:1 (+)	1,5 (+)	64 (+)	<b>Y<sub>8</sub></b>

### 2.3 MONTAJE Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las pruebas para la transesterificación de aceite sintético de microalgas se llevaron a cabo haciendo uso de KOH como catalizador en un reactor Batch de 2000 mL equipado con un sistema de agitación electromagnético operando a 400 rpm (revoluciones por minuto). El grado de agitación ha sido seleccionado teniendo en cuenta que estudios anteriores han reportan una reacción incompleta con 180 rpm y una igual producción de metilésteres para 360 rpm y 600 rpm<sup>[13]</sup>. El proceso de obtención de biodiesel a escala laboratorio (Figura 4) se reduce a la utilización de equipos no muy sofisticados. Sin embargo, se requiere del manejo controlado de las variables de operación; éstas se ajustaron a diferentes valores para analizar los resultados de las combinaciones propuestas en la Tabla 3. Las

variables de operación fueron: relaciones molares metanol/aceite de 6:1 y 12:1, cantidades de catalizador en base al peso del aceite de 0.7 (p/p) y 1.5 (p/p) y temperaturas de 45°C y 64 °C.

Figura 4. Proceso de producción de biodiesel



Una vez seleccionada la combinación de variables se realizó el montaje del proceso (Figura 5), el cual se compuso de una plancha de calentamiento y un balón de cuatro entradas para el acople de un sistema de condensación, un termómetro, la termocupla de la plancha y el acceso de la mezcla reaccionante del metóxido. La mezcla del metóxido (metanol-KOH) se preparó en las proporciones indicadas conforme a lo expuesto en la Tabla 3. Los valores numéricos de metanol en mililitros y KOH en gramos se obtuvieron en relación al peso molecular del aceite sintético de microalgas: 1097.528 g/mol, el cual fue obtenido por pruebas de saponificación y acidez (índice de acidez, 0.233 mg KOH/g aceite; índice de saponificación, 153.578 mg KOH/g aceite) descritas en el Anexo C.

*Figura 5. Montaje experimental para la producción de biodiesel a partir de aceite sintético de Chlorella Vulgaris*



Las cantidades necesarias de alcohol y catalizador fueron medidas y trasladadas a un sistema cerrado para su posterior calentamiento a baja temperatura y agitación constante con el fin de evitar la contaminación y volatilización de las especies durante el proceso de disolución completa. El metóxido obtenido fue transferido a un embudo de decantación para ser ingresado luego al sistema reaccionante en el balón. Se tuvo precaución de prevenir la absorción de humedad y mantener la actividad catalítica preparando soluciones frescas del metóxido. Se ha encontrado que aún una pequeña cantidad de agua en el alimento puede causar la reducción en conversión de metilésteres de ácidos grasos y en lugar de éstos generar la formación de jabón <sup>[9,13]</sup>.

Paralelamente se midió la cantidad de aceite a ingresar al balón y se sometió a calentamiento antes de que se agregara el metóxido; esto con el fin de eliminar la humedad que pudiera encontrarse en el aceite y para estabilizar la temperatura de la plancha de calentamiento al valor deseado. Una vez alcanzada la condición deseada de temperatura se ingresó el metóxido en forma lenta y constante desde el embudo, y simultáneamente se abrió paso al agua del sistema de condensación y se ajustó el tiempo deseado de reacción (1 hora). Durante este periodo se

controló la temperatura para evitar que esta variable se modificara. Dado que la reacción de transesterificación es una reacción exotérmica que genera un aumento de temperatura en el sistema, fue necesario manipular el valor de la misma desde la plancha y con ayuda del termómetro para evitar cambios bruscos.

Una vez terminada la reacción se dejó enfriar la mezcla por unos minutos y se trasladó a un embudo de decantación en el cual permaneció durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se pudo observar la clara formación de dos fases (Figura 6): una fase más viscosa y densa, que consiste en una mezcla de glicerol, jabones, catalizador, metanol y agua, denominada glicerol crudo y una fase más liviana, que contiene los metilésteres que conforman el biodiesel, junto con metanol, pequeñas proporciones de catalizador, monoglicéridos y diglicéridos <sup>[14]</sup>.

*Figura 6. Separación las fases obtenidas después de la reacción de transesterificación.*



Después de la separación de las dos fases presentes en el embudo se midió el pH de la fase liviana buscando obtener valores neutros. Para valores altos de pH fue necesario neutralizar la mezcla de metilésteres, lo cual se logró mediante el lavado de la fase liviana con agua destilada en proporción 1:1. La mezcla se agitó durante un breve tiempo y se dejó reposar durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se ve

claramente la separación del agua de la fase liviana (Figura 7), y se realiza una nueva medición de pH en los metilésteres para confirmar su neutralización.

*Figura 7. Neutralización de la fase liviana con agua destilada.*



## **2.4 METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO**

**2.4.1 Densidad.** La densidad se define como la masa por unidad de volumen a una temperatura determinada (25°C) y es una medida indirecta del contenido energético del combustible; valores elevados de densidad indican mayores cantidades de energía y economía del combustible<sup>[15]</sup>. Sin embargo, un valor bajo de densidad en el producto final es un índice de reacción completa y remoción de glicerina pesada<sup>[2]</sup>. La densidad fue medida haciendo uso de un picnómetro de 2mL y una balanza analítica.

**2.4.2 Viscosidad.** Es la resistencia que ofrece un líquido a fluir y se obtiene midiendo el tiempo en el que un volumen fijo de muestra fluye por efecto de la gravedad por el tubo capilar de un viscosímetro calibrado a una temperatura determinada. La viscosidad es una de las especificaciones más importantes del

biodiesel; un valor elevado de este trae consigo problemas en los inyectores y en el sistema de bombeo, acortando la vida del motor. Primordialmente depende de la composición del ácido graso de partida y del proceso de transesterificación <sup>[8,16]</sup>. La viscosidad máxima permitida está limitada por las dimensiones y diseño del motor y por las características del sistema de inyección. El límite superior de viscosidad del biodiesel ( $6,0 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ), es más alto que la viscosidad máxima permitida para el diesel extra colombiano ( $4,1 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Las mezclas de biodiesel con diesel extra cercano a la especificación superior, pueden dar como resultado una mezcla con viscosidad superior a la especificación de la NTC 1438 <sup>[17]</sup>. Las pruebas de viscosidad se llevaron a cabo en un viscosímetro Brookfield RVDV-III + Rheometer RP74107.

**2.4.3 Índice de refracción.** El índice de refracción es característico de cada aceite e indica el contenido de ácidos grasos insaturados presentes en el aceite; a menor saturación, mayor índice de refracción. Una diferencia en el índice de refracción a lo largo de la reacción de transesterificación revela que la conversión a ésteres se está llevando a cabo, debido a que disminuye a medida que transcurre la reacción <sup>[18]</sup>. El índice de refracción fue medido con un refractómetro Fisher Scientific Abbe a  $24^\circ\text{C}$ .

**2.4.4 Espectro Infrarrojo.** La espectroscopía infrarroja, o IR, es un tipo de espectroscopía vibracional, la cual consiste en un análisis de vibraciones moleculares. Cada compuesto químico tiene asociado un espectro infrarrojo característico, donde los máximos de absorción corresponden a determinadas energías de vibración de los enlaces químicos presentes. Por tanto, esta técnica permite detectar la presencia de diferentes compuestos en el material analizado. El espectro infrarrojo se obtuvo de un espectrómetro FTIR-8400S (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer).

**2.4.5 Punto de nube.** El punto de nube Indica la temperatura a la cual empiezan a precipitar ciertos compuestos del combustible (parafinas, materia insaponificable, etc.) y es una medida muy importante a tener en cuenta cuando se utiliza en motores a temperaturas bajas. La presencia de ceras solidificadas puede llegar a obstruir los filtros y los inyectores de los motores. Este material también puede llegar a formar emulsiones con agua. Por tanto, el valor debe ser definido por el usuario, dependiendo del clima en el cual se utilice el motor. El biodiesel posee malas propiedades a bajas temperaturas. Un biodiesel procedente de un aceite residual tiene un punto de nube entre -7 y 0°C, lo cual representa un inconveniente para el invierno riguroso de algunos países. Por tanto, encontrar un bajo punto de nube en el biodiesel obtenido a partir de microalgas representaría un valor agregado en el producto que se desea obtener y la posibilidad de emplear este combustible en mayor proporción (B100) <sup>[17,19]</sup>.

**2.4.6 Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).** La HPLC es ampliamente empleada para la determinación de triglicéridos en grasas y aceites de origen vegetal. Esta determinación de triglicéridos en aceites y grasas se realiza comúnmente por el método HPLC de fase reversa no acuosa con elución isocrática, recomendado por el IUPAC, el cual usa el detector de índice de refracción, logrando separaciones basadas en el número de carbonos de los triglicéridos <sup>[11]</sup>.

### 3. RESULTADOS Y ANALISIS

A continuación se expondrán los resultados encontrados de las diferentes pruebas de caracterización a las que fue sometido el producto obtenido y se hará un respectivo análisis de cada uno de ellos.

#### 3.1 RESULTADOS Y OBSERVACIONES DE LOS EXPERIMENTOS

Al finalizar la reacción se pudo observar de manera casi inmediata la formación de dos fases, lo cual asegura que la metodología desarrollada para la transesterificación del aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* con metanol-KOH es apta para la producción de biodiesel independientemente de la combinación de variables del diseño factorial.

Se pudo observar que la reacción de transesterificación a diferentes relaciones molares metanol/aceite se comportaron de manera similar durante la operación, aunque cabe anotar que al finalizar la reacción, el producto obtenido era de un color mas turbio en la relación molar metanol/aceite 12:1 comparado con la relación 6:1. Este comportamiento se debe a que la presencia de una mayor cantidad de alcohol hace que la separación de las fases se desarrolle a una menor velocidad, ya que el exceso del mismo impide la rápida y total decantación de la glicerina <sup>[2,14]</sup>.

El producto obtenido de ciertas combinaciones de variables experimentales arrojó un valor muy básico de pH, por lo cual fue necesario lavar la fase liviana obtenida para reducir este valor hasta un pH neutro. Este valor básico presente en el producto se debe a que en estas combinaciones la concentración del catalizador era de 1.5 p/p y su relación molar metanol/aceite de 12:1, lo cual dio lugar a la deposición del catalizador básico en ambas fases.

Tabla 4. Cantidad obtenida de productos.

Prueba	Variables de diseño			Fase liviana (mL)	Fase pesada (mL)	pH
	Relación molar CH <sub>3</sub> OH/aceite	Cantidad de KOH (p/p)	Temperatura (°C)			
1	6:1 (-)	0,7 (-)	45 (-)	250	27	7
2	12:1 (+)	0,7 (-)	45 (-)	255	51	7
3	6:1 (-)	1,5 (+)	45 (-)	250	36	7
4	12:1 (+)	1,5 (+)	45 (-)	254	70	9
5	6:1 (-)	0,7 (-)	64 (+)	250	28	7
6	12:1 (+)	0,7 (-)	64 (+)	254	49	7
7	6:1 (-)	1,5 (+)	64 (+)	246	45	7
8	12:1 (+)	1,5 (+)	64 (+)	250	72	9

Como se puede ver en la Tabla 4, se obtuvieron volúmenes similares de biodiesel (fase liviana) en relación a la cantidad del aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* que se utilizó como materia prima (250mL). Este comportamiento no varía significativamente con la manipulación de las variables a modificar. En cuanto a la cantidad de mililitros de la fase pesada, compuesta mayormente por glicerina, se puede observar que este volumen es relativamente bajo en las pruebas 1 y 5. A partir de lo anterior, se tiene que al trabajar con niveles bajos de concentración de catalizador (0,7 p/p) y de relación molar metanol/aceite (6:1), se obtienen las menores cantidades de glicerina; mientras que trabajando con niveles altos de dichas variables se obtiene una mayor cantidad del subproducto. A excepción de las combinaciones de las variables que presentaban los niveles altos de relación molar metanol/aceite (12:1) y de cantidad de catalizador (1,5 p/p), los cuales presentaron un pH básico (9), las demás pruebas reportaron un valor neutro de pH, el cual es el valor deseado recomendado en la literatura.

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO

Los resultados de las pruebas de caracterización que se realizaron en el producto obtenido se resumen en la Tabla 5, donde se muestran los valores encontrados en mediciones de densidad, viscosidad, índice de refracción, pH (después del lavado

de las muestras que así lo requirieron) y punto de nube. Estos valores fueron comparados con los reportados en la norma ASTM para biodiesel (Tabla 6) <sup>[20]</sup>.

*Tabla 5. Resultados de pruebas de caracterización.*

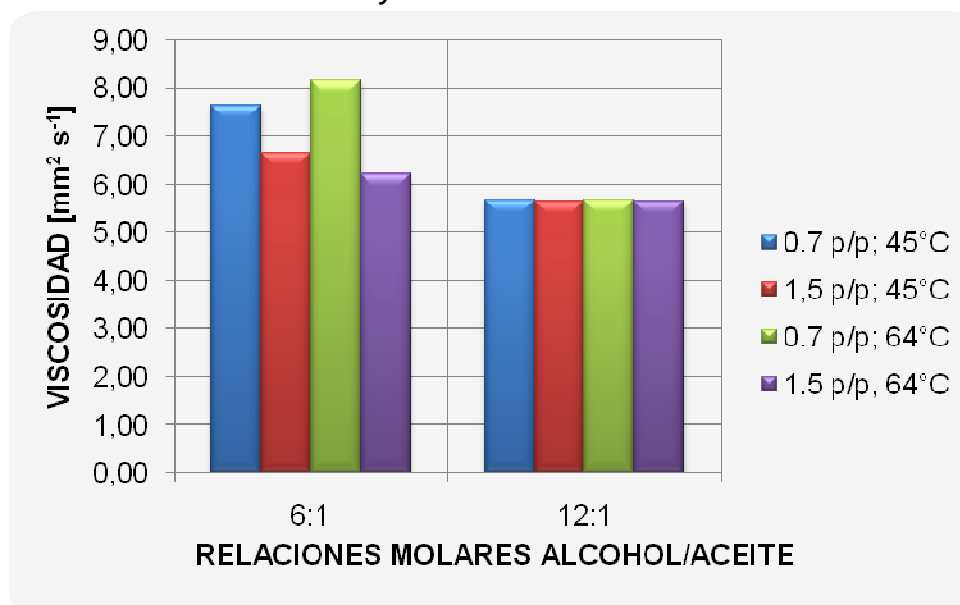
Prueba	Índice de Refracción (26°C)	Densidad (g/mL)	Viscosidad (mm <sup>2</sup> /s)	Punto de Nube (°C)	pH
1	1.4545	0.8249	7.69	15	7
2	1.4535	0.8204	5.73	14	7
3	1.4544	0.8184	6.70	15	7
4	1.4549	0.8177	5.70	13	7
5	1.4560	0.8268	8.24	9	7
6	1.4570	0.8185	5.74	15	7
7	1.4580	0.8254	6.28	13	7
8	1.4580	0.8219	5.72	15	7

*Tabla 6. Norma ASTM (American Society for Testing and Materials) de máximos valores permitidos para biodiesel.*

NORMA	Densidad a 15°C (g cm <sup>-3</sup> )	Viscosidad cinemática a 40°C (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	Punto de nube (°C)
ASTM D6751	0.86 a 0.9	1.9 a 6	-3 a 12

**Viscosidad:** Se puede observar que las pruebas 2, 4, 6 y 8 reportan valores de viscosidad dentro del rango permitido por la norma ASTM D6751 (Figura 9). Estos experimentos tienen como característica particular que en todos ellos se trabaja con el nivel más alto de relación molar metanol/aceite (12:1), y se encuentra una viscosidad de 5.7 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> independientemente del nivel de concentración de catalizador y temperatura de reacción. Al trabajar con bajos niveles de concentración de catalizador (0.7 p/p) y de relación molar metanol/aceite (6:1), se obtienen las mayores viscosidades independientemente de la temperatura.

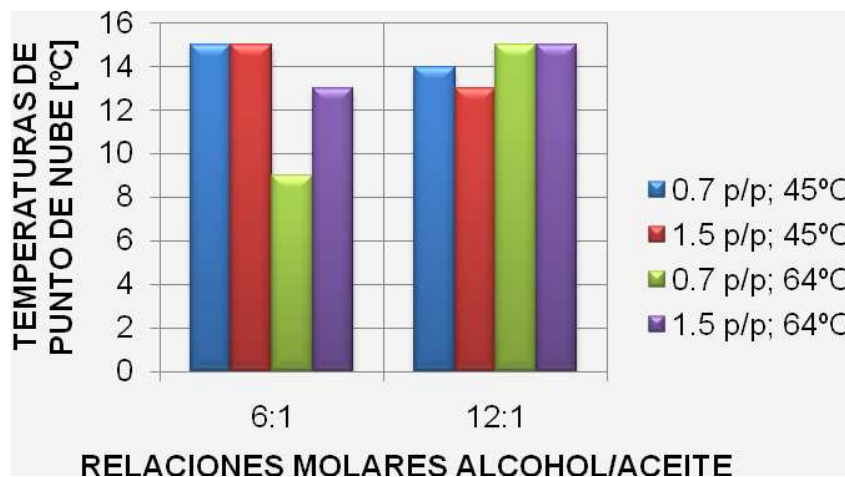
Figura 9. Viscosidades obtenidas a las diferentes condiciones de temperatura, relación molar y concentración de catalizador.



**Índice de refracción:** Al comparar los resultados reportados en la Tabla 5 con el índice de refracción del aceite sintético (1,4748) se puede observar que para el producto obtenido en todas las muestras se presentó una disminución significativa en esta propiedad, lo cual asegura un alto grado de conversión.

**Punto de Nube:** Al trabajar con el nivel alto de temperatura (64°C) y en relaciones molares metanol/aceite 6:1, se favorecen las propiedades de temperaturas bajas del biodiesel, como el punto de nube, obteniéndose el mejor resultado con el nivel bajo de concentración de catalizador. Por el contrario, al trabajar con el nivel alto de temperatura a relaciones molares metanol/aceite 12:1, se ven afectadas estas propiedades (Ver Figura 10). Sin embargo, trabajando con el nivel bajo de temperatura en las relaciones 12:1 el uso del nivel alto de catalizador favorece la disminución del punto de nube. El punto de nube más bajo y por lo tanto el más apropiado por encontrarse dentro del rango permitido en la norma ASTM D6751, fue encontrado al trabajar en los niveles bajos de relación molar (6:1) y concentración de catalizador (0.7 p/p) y en el nivel alto de temperatura (64°C).

Figura 10. Temperaturas de punto de nube obtenidas a las diferentes condiciones de temperatura, relación molar y concentración de catalizador.



**Densidad:** Se encontró que la densidad de todas las muestras del biodiesel obtenido a partir del aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* se encuentran por debajo del rango máximo permitido, con valores entre 0.818 y 0.827 g mL<sup>-1</sup>. Este resultado es favorable, dado que una densidad baja da lugar a una baja gravedad específica, lo cual es un índice del alto grado de conversión y de la efectiva remoción de glicerina de la fase liviana <sup>[12]</sup>.

**Espectro infrarrojo:** Las curvas de los espectros de todos los productos obtenidos exhiben los mismos picos característicos, es decir, presentan los mismos grupos funcionales, aunque unos se pronuncian más que otros. Con este resultado cualitativo se puede asegurar la formación de monoalquilésteres de ácidos grasos de cadena larga, es decir, la producción de biodiesel. El espectro infrarrojo de cada uno de los experimentos se pueden observar en el Anexo D.

**Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC):** Los resultados obtenidos de esta prueba se pueden observar en la Tabla 7. Este análisis muestra que las pruebas con mayor grado de conversión son aquellas en las que se trabaja con

niveles altos de relación molar metanol/aceite y de concentración de catalizador (% FAME > 98%), independientemente de los niveles utilizados en las demás variables. Cabe recordar que estos dos experimentos fueron aquellos en los cuales se requirió lavar con agua destilada para neutralizar su pH. Un escaso contenido de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos será muy favorable en el producto que se desea obtener, por lo tanto, a partir de lo obtenido con bajas relaciones molares y baja concentración de catalizador (% FAME < 88%) se puede inferir que estas condiciones no son favorables para el rendimiento de la reacción de transesterificación.

*Tabla 7. Resultados de caracterización por cromatografía líquida (HPLC)*

Prueba	Variables de diseño			%FAME	%TG	%DG	%MG
	Relación molar CH <sub>3</sub> OH/aceite	Cantidad de KOH (w/w)	Temperatura (°C)				
1	6:1 (-)	0,7 (-)	45 (-)	87.63	6.63	4.7	1.05
2	12:1 (+)	0,7 (-)	45 (-)	97.66	0.49	1.25	0.6
3	6:1 (-)	1,5 (+)	45 (-)	93.5	3.93	2.02	0.55
4	<b>12:1 (+)</b>	<b>1,5 (+)</b>	<b>45 (-)</b>	<b>98.29</b>	<b>0.34</b>	<b>1.09</b>	<b>0.28</b>
5	6:1 (-)	0,7 (-)	64 (+)	82.81	10.34	5.62	1.23
6	12:1 (+)	0,7 (-)	64 (+)	97.97	0.29	1.15	0.6
7	6:1 (-)	1,5 (+)	64 (+)	96.16	1.69	1.65	0.5
8	<b>12:1 (+)</b>	<b>1,5 (+)</b>	<b>64 (+)</b>	<b>98.2</b>	<b>0.31</b>	<b>1.22</b>	<b>0.27</b>

Al analizar el diseño experimental propuesto y los resultados de la caracterización por cromatografía líquida, se tomó la cantidad de métilésteres de ácidos grasos presentes en las muestras del biodiesel obtenido (% FAME), como una medida de respuesta de las variables de diseño. A partir de esta información se determinó el efecto o cambio en la respuesta al pasar del nivel bajo (-) al nivel alto (+) del factor analizado, que para el caso de la relación molar (A), permitió evaluar el ‘efecto principal de la relación molar’ A, el cual mide el efecto medio de dicha variable a todas las condiciones de las demás variables. Se encontró que la media de las cuatro diferencias es de +8,005 (Tabla 8).

Tabla 8. Medida individual del cambio de relación molar CH<sub>3</sub>OH/aceite

Diferencias	Medida Individual del efecto de cambiar la relación molar	Cantidad de catalizador	Temperatura de reacción
	CH <sub>3</sub> OH/aceite de 6:1 (-) a 12:1 (+)	KOH p/p en base al aceite	°C
Y <sub>2</sub> -Y <sub>1</sub>	10,03	0,7	45
Y <sub>4</sub> -Y <sub>3</sub>	4,79	1,5	45
Y <sub>6</sub> -Y <sub>5</sub>	15,16	0,7	64
Y <sub>8</sub> -Y <sub>7</sub>	2,04	1,5	64
<b>Efecto principal debido a la relación molar: A = 8,005</b>			

Las Tablas 9 y 10, reportan la medida individual de los efectos de cambiar la cantidad del catalizador y la temperatura de reacción, respectivamente; se puede notar que se utilizan todas las observaciones para proporcionar información de cada uno de los efectos principales, y que cada efecto se determina con la precisión de una diferencia replicada cuatro veces.

Tabla 9. Medida individual del cambio de cantidad de catalizador

Diferencias	Medida Individual del efecto de cambiar la cantidad de catalizador	Relación molar	Temperatura de reacción
	p/p KOH de 0,7 (-) a 1,5 (+)	CH <sub>3</sub> OH/aceite	°C
Y <sub>3</sub> -Y <sub>1</sub>	5,87	6:1	45
Y <sub>4</sub> -Y <sub>2</sub>	0,63	12:1	45
Y <sub>7</sub> -Y <sub>5</sub>	13,35	6:1	64
Y <sub>8</sub> -Y <sub>6</sub>	0,23	12:1	64
<b>Efecto principal debido a la cantidad de catalizador: B = 5,02</b>			

Tabla 10. Medida individual del cambio en la temperatura de reacción

Diferencias	Medida Individual del efecto de cambiar la temperatura de reacción	Relación molar	Cantidad de catalizador
	de 45 (-) a 64 (+) °C	CH <sub>3</sub> OH/aceite	°C
Y <sub>5</sub> -Y <sub>1</sub>	-4,82	0,7	45
Y <sub>6</sub> -Y <sub>2</sub>	0,31	1,5	45
Y <sub>7</sub> -Y <sub>3</sub>	2,66	0,7	64
Y <sub>8</sub> -Y <sub>4</sub>	-0,09	1,5	64
<b>Efecto principal debido a la temperatura de reacción: C = -0,485</b>			

Para determinar la interacción entre la relación molar metanol/aceite y la temperatura de reacción, se tiene en cuenta que esta medida proporciona información sobre la diferencia entre el efecto medio de la relación molar a una temperatura de 45°C y a 64°C. De este modo se obtuvo la interacción entre la relación molar y la temperatura A x C, al igual que para el caso de la interacción entre la relación molar metanol/aceite y la cantidad de catalizador A x B, y entre la cantidad de catalizador y la temperatura de reacción B x C (Tablas 11, 12 y 13)

Tabla 11. Efecto de la interacción entre la relación molar y la temperatura

Temperatura de reacción (C)	Efecto medio de la relación molar (A)
<b>64°C (+)</b>	$= \frac{1}{2} (Y_6 - Y_5 + Y_8 - Y_7)$ $= 8,6$
<b>45°C (-)</b>	$= \frac{1}{2} (Y_4 - Y_3 + Y_2 - Y_1)$ $= 7,41$
<b>Interacción A x C = <math>\frac{1}{2} (8,6 - 7,41) = 0,595</math></b>	

Tabla 12. Efecto de interacción entre relación molar y cantidad de catalizador

Cantidad de catalizador (B)	Efecto medio de la relación molar (A)
<b>1,5 p/p (+)</b>	$= \frac{1}{2} (Y_4 - Y_3 + Y_8 - Y_7)$ $= 3,415$
<b>0,7 p/p (-)</b>	$= \frac{1}{2} (Y_6 - Y_5 + Y_2 - Y_1)$ $= 12,595$
<b>Interacción A x B = <math>\frac{1}{2} (3,415 - 12,595) = -4,59</math></b>	

Tabla 13. Efecto de interacción entre cantidad de catalizador y temperatura

Temperatura de reacción (C)	Efecto medio de la cantidad de catalizador (B)
<b>64°C (+)</b>	$= \frac{1}{2} (Y_4 - Y_2 + Y_3 - Y_1)$ $= 3,25$
<b>45°C (-)</b>	$= \frac{1}{2} (Y_8 - Y_6 + Y_7 - Y_5)$ $= 6,79$
<b>Interacción B x C = <math>\frac{1}{2} (3,25 - 6,79) = -1,77</math></b>	

Los resultados del análisis factorial se resumen en la Tabla 14, donde puede observarse que existe un efecto grande debido a la variación en la relación molar metanol/aceite  $A = 8.005$ , pero no hay independencia significativa en su efecto individual que permita concluir que existe un efecto debido específicamente a la variación de esta la relación molar, dado que existe una alta interacción con la cantidad de catalizador  $A \times B = -4,59$ , que sobresale entre las demás interacciones. A pesar de que las interacciones que involucran la temperatura son relativamente menores su efecto individual es pequeño  $C = -0,485$ .

*Tabla 14. Resumen de efectos individuales e interacciones encontradas*

Efecto	Estimación
<b>Media</b>	94,028
<b>Efectos Principales</b>	
<b>A: Relación molar</b>	8,005
<b>B: Cantidad de catalizador</b>	5,02
<b>C: Temperatura</b>	-0,485
<b>Interacción entre factores</b>	
<b>A x C</b>	0,595
<b>A x B</b>	-4,59
<b>B x C</b>	-1,77

Se observa la gran diferencia de comportamiento del efecto de variar la relación molar en los dos niveles de cantidad de catalizador experimentados. Cuando la cantidad de catalizador se fija a 1.5 p/p en base al peso del aceite, el efecto de variar la relación molar metanol/aceite de 12:1 a 6:1 es disminuir en 3.4% la cantidad de metilésteres de ácidos grasos (FAME) formados durante la reacción de transesterificación. Mientras que si la cantidad de catalizador que se fija es de 0.7 p/p y se varía la relación molar de 12:1 a 6:1 el efecto en la formación de metilésteres se incrementa drásticamente hasta disminuir en un 13% aproximadamente.

#### 4. CONCLUSIONES

La metodología empleada para la formulación del aceite sintético resulta adecuada para la obtención de materias primas con perfiles lipídicos característicos de las microalgas.

De acuerdo a la caracterización del biodiesel obtenido referente a densidad, índice de refracción y contenido de metilésteres de ácidos grasos (%FAME), el proceso de transesterificación de aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* en medio básico (KOH) con metanol permite altos grados de conversión de los triglicéridos presentes en el aceite, y también una efectiva remoción de glicerina de la fase liviana.

Al analizar el diseño experimental propuesto se encontró que la temperatura de reacción no da lugar a efectos significativos en el contenido de metilésteres de ácidos grasos encontrado en el producto. La interacción de mayor grado de incidencia sobre el proceso será aquella que se establezca al variar la concentración de catalizador junto con la relación molar metanol/aceite. Sin embargo, los diferentes niveles evaluados en las variables de operación no influyen significativamente en la cantidad de biodiesel obtenido a partir de las materias primas y reactivos utilizados.

Al trabajar con los niveles bajos de concentración de catalizador KOH (0,7 p/p) y de relación molar metanol/aceite (6:1), se obtuvieron las menores cantidades de glicerina, las mayores viscosidades y el menor contenido de metilésteres de ácidos grasos en el producto final (% FAME < 88%), independientemente de la temperatura de reacción. Lo anterior es sinónimo de un grado de conversión relativamente bajo en el proceso de obtención de un producto que eventualmente puede presentar problemas en el sistema de inyección de los motores. Sin embargo al combinar estas condiciones con un nivel alto de temperatura de hasta

64°C, se favorecen las propiedades del biodiesel a temperaturas bajas confiriéndole mayor aceptación en climas fríos.

Por otro lado, al trabajar con niveles altos de concentración de catalizador KOH (1,5 p/p) y relación molar metanol/aceite (12:1), se obtuvo una mayor cantidad de fase pesada como subproducto, y el biodiesel producido presentó una menor viscosidad dentro de los límites máximos permitidos en la norma ASTM D6751 y un mayor contenido de metilésteres (% FAME > 98%). No obstante, el producto deseado presenta un pH básico y mayor turbiedad, requiriendo por tanto un posterior tratamiento de lavado y mayor tiempo de separación de fases. A estas condiciones, una temperatura de 64°C afectará las propiedades del biodiesel a temperaturas bajas.

## 5. RECOMENDACIONES

Para el desarrollo de trabajos posteriores enfocados en la obtención de biodiesel a partir de aceite de microalgas mediante transesterificación, es importante que la materia prima que se utilice se encuentre totalmente seca, calentar el aceite antes de empezar la reacción para eliminar la humedad y evitar que el catalizador permanezca mucho tiempo en contacto con el aire es lo más aconsejable, ya que el agua favorece la formación de jabones por saponificación, dificultando la purificación del biodiesel.

La adición del metóxido (mezcla metanol-catalizador) al sistema debe ser lenta, ya que al momento que entra en contacto con el aceite, se presentan variaciones en la temperatura que deben ajustarse de nuevo hasta alcanzar la temperatura deseada.

Después de la separación de las fases es aconsejable lavar la fase liviana con agua destilada a temperatura ambiente así el pH de la misma presente directamente un valor neutro, ya que como se pudo observar el lavado mejora las características del producto final.

El agua que se utiliza en el proceso para el sistema de condensación puede ser reutilizada debido a que no sufre ningún cambio químico ni alteración significativa en su temperatura, esto con el fin de evitar el desperdicio de este valioso recurso en futuras pruebas a nivel de laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] LI, Shiwu. WANG, Yunpeng. SHENGWU, Dong. CHEN, Yang. CAO, Fenghua. CHAI, Fang. y WANG, Xiaohong. Biodiesel production from Eruca Sativa vegetable oil and motor, emissions properties. En: Renewable Energy. 2009, Vol. 34, p. 1871-1876.

[2] SHARMA, Y. SINGH, B. y UPADHYAY, S. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. En: Fuel. 2008, Vol. 87, p. 2355-2373.

[3] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. En: Biotechnology Advances. 2007, Vol. 25, p. 294-306.

[4] DEMIRBAS, Ayhan. Progress and recent trends in biodiesel fuels. En: Energy Conversion and Management. 2009, Vol. 50, p. 14-34.

[5] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Políticas y programas misionales. Bogotá, Colombia. 2010 En: <http://www.minagricultura.gov.co/02componentes/05biocombustible.aspx>

[6] CASTRO, Paula. Opciones para la producción y uso del biodiesel en el Perú. Soluciones prácticas. Lima Perú. 2006 <http://scielo.org.pe/pdf/mc/v2n2/a06v2n2.pdf>

[7] SHARMA, Y. y SINGH, B. Development of biodiesel from karanja. En: Fuel. 2007, [doi:10.1016/j.fuel.2007.08.001](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.08.001)

[8] RAMADHAS, A. JAYARAJ, S. y MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. En: Fuel. 2005, Vol. 84, p. 335-340.

[9] ELLIS, N. GUAN, F. CHEN, T. y POON, C. Monitoring biodiesel production (transesterification) using in situ viscometer. En: Chemical Engineering Journal, [doi:10.1016/j.cej.2007.06.03](https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.06.03)

[10] MOUSDALE, David. Biofuels. Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2008, p. 285-293.

[11] ARRUBLA, Juan. Transesterificación del aceite de palma y análisis de triglicéridos por cromatografía de gases capilar de alta. Trabajo de grado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2002.

[12] MIAO, Xiaoling. y WU, Qingyu. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. En: *Bioresource Technology*. 2006, Vol. 97, p. 841-846.

[13] MEHER, L. DHARMAGADDA, V y NAIK, S. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. En: *Bioresource Technology*. 2006, Vol. 97, p. 1392-1397.

[14] ROBALINO, Carlos Samuel. Elaboración de un Manual de Operación de un Reactor Experimental de Transesterificación para la obtención de biodiesel proveniente de Aceite Vegetal. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil. Ecuador. 2009

[15] KNOTHE, Gerhard. GERPEN, Jhon van y KRAHL, Jurgen. The Biodiesel Handbook. Champaign, Illinois. 2004.

[16] FERREIRA, Antonio. MONTEIRO, Marcos. AMBROZIN, Alexandra y MORAIS, Luciano. Critical review on analytical for biodiesel characterization. En: *Talanta*. 2008, Vol. 77, p. 593-605.

[17] DAZA, Johanna Christie. Especificaciones de biodiesel para uso en motores diesel. Proyecto de norma técnica colombiana.

[http://www.fedepalma.org/document/2006/NormaDE\\_100\\_04\\_Biodiesel.pdf](http://www.fedepalma.org/document/2006/NormaDE_100_04_Biodiesel.pdf)

[18] COHA, Pablo y ROJAS Laura. Obtención y caracterización de biodiesel por medio de la transesterificación en medio básico del aceite de higuierilla con diferentes alcoholes. Trabajo de grado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. 2009.

[19] MOTA, David. Evaluación del método base-base con etanol para la obtención de biodiesel a partir de aceite oxidado de piñón (*Jatropha Curcas*) a nivel laboratorio. Trabajo de grado. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. 2007.

[20] LOTERO, Edgar. LIU, Yijun. LÓPEZ, Dora. SUWANNAKARN, Keewta. BRUCE, David y GOODWIN, James. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. South California: Clemson University. Department of Chemical Engineering. 2005.

[21] PLATA, V. Kafarov, V. y Moreno, N. Producción de biocombustibles de tercera generación: Transesterificación de aceite sintético de microalgas para la producción de biodiesel. En: IV Simposio de Química Aplicada. Armenia, Colombia, Septiembre, 2009.

[22] FUKUDA, Hideki. KONDO, Akihiko. y NODA, Hideo. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. 2001, Vol 92 (5), p. 405-416.

## ANEXO A

### Metodología para la preparación de aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* a partir de aceites vegetales.

Petkov & García (2007) reportan la composición media de los ácidos grasos presentes en el aceite de tres especies de microalgas de la familia *Chlorella*, cultivadas bajo diferentes condiciones de crecimiento; cualquier desviación a este perfil lipídico corresponde a impurezas presentes en el aceite. En este perfil lipídico se encuentran ácidos grasos de cadena carbonada 14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2, y  $\alpha$ -18:3.

Los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de la microalga *Chlorella Vulgaris* cultivada a la intemperie se pueden agrupar según el grado de insaturación de los mismos. Así, 14:0, 16:0 y 18:0 se agrupan como ácidos grasos saturados y su porcentaje másico en la mezcla se calcula igual a 13%. De igual forma, se agrupan 16:1 y 18:1 como mono-insaturados, 16:2 y 18:2 como di-insaturados y 16:3 y  $\alpha$ -18:3 como tri-insaturados.

Tabla A1. Porcentajes másicos de ácidos grasos saturados e insaturados presentes en el aceite de *Chlorella Vulgaris* cultivada a la intemperie.

Tipo de ácidos grasos	% Másico
<b>Saturados</b>	13
<b>mono-insaturados</b>	20
<b>di-insaturados</b>	28
<b>tri-insaturados</b>	39

A partir de dicha información se propone la búsqueda de diferentes aceites que de acuerdo a su composición puedan ser utilizados en la preparación de una mezcla de aceites que simule al aceite de *Chlorella Vulgaris*. Ma & Hanna (1999) reportan la composición de diversos aceites vegetales. Las proporciones másicas de los aceites seleccionados corresponderán a la convergencia de un modelo matemático basado en un sistema de ecuaciones lineales descritas a continuación y que constituyen el balance de masa de los principales ácidos grasos saturados,

mono-insaturados, di-insaturados y tri-insaturados presentes en el aceite sintético.

$$W_B C_{B1} + W_C C_{C1} + W_D C_{D1} + W_E C_{E1} = W_A C_{A1}$$

$$W_B C_{B2} + W_C C_{C2} + W_D C_{D2} + W_E C_{E2} = W_A C_{A2}$$

$$W_B C_{B3} + W_C C_{C3} + W_D C_{D3} + W_E C_{E3} = W_A C_{A3}$$

$$W_B C_{B4} + W_C C_{C4} + W_D C_{D4} + W_E C_{E4} = W_A C_{A4}$$

En donde  $W$  representa la masa de aceite,  $C_{ij}$  la composición másica en el aceite  $i$  de los ácidos grasos  $j$ ,  $A$  aceite de microalgas,  $B$  aceite de linaza,  $C$  aceite de girasol,  $D$  aceite de oliva,  $E$  superestearina de palma, 1 saturados, 2 mono-insaturados, 3 di-insaturados y 4 tri-insaturados.

### Procedimiento

- Pesarse una muestra de aceite de linaza, una muestra de aceite de girasol, una muestra de aceite de oliva y una muestra de superestearina de palma.
- Calentar las muestras anteriores a una temperatura superior a 65°C y mezclarlas en un vaso de precipitados.
- Mantener la mezcla anteriormente preparada en un horno durante 1 hora a 110°C, para eliminar el agua que pueda estar presente (Sharma, Y.C. & Singh, B., 2009).

## ANEXO B

### Determinación cuantitativa de ácidos grasos para la elaboración del aceite sintético de *Chlorella Vulgaris* según normas ISO 5508 y ISO 5509

El Laboratorio de Cromatografía de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander facilitó el análisis de ácidos grasos, el cual se llevó a cabo mediante la obtención y cuantificación de sus metilésteres por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-F10). Según las normas ISO 5509 (“*Animal and vegetable Fats and Oils – Preparation of Methyl Ester of Fatty Acids*”) y SS08 (“*Animal and Vegetable Fats and Oils – Analysis by Gas Chromatography of Methyl Ester of Fatty Acids*”), respectivamente. Como materiales de referencia certificados se emplearon la mezcla Supelco™ 37 Component FAME Mix, Supelco, Bellefonte, PA, Cat N 47885-U y la mezcla estándares de metilésteres de ácidos grasos GLC-10, GLC-50, GLC-70, GLC-80, GLC-100, Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU. el análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue DB-23 (J & W Scientific Folsom, CA, EE.UU.) [50%-cianopropl-poli(metilsiloxano), 60 mm x 0.25 mm x 0.25 µm], la inyección se realizó en modo *Split* (10:1)(V:2µL)

## RESULTADOS

### Análisis Cualitativo

Para la identificación de los metilésteres de ácidos grasos presentes en las muestras, se utilizó el método de comparación de sus tiempos de retención con los de patrones certificados (mezcla de estándares GLC-10, GLC-50, GLC-70, GLC-80, GLC-100, Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU.) y Supeico™ 37 Component FAME Mix, (Supeico, Bellefonte, PA, Cat. N 47885-U), analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas.

### Análisis cuantitativo

El porcentaje relativo (%) de ácidos grasos en las muestras analizadas se determinó según la norma ISO 5508 “*Animal and Vegetable Fats and Oils – Analysis by Gas Chromatography of Methyl Ester of Fatty Acids*”.

Tabla B1. Determinación cuantitativa de ácidos grasos presentes en la superesterarina de palma

Ácidos grasos presentes en la superestearina de palma	Cantidad Relativa %		
	1 medición	2 medición	Promedio
Caprílico (C8:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Cáprico (C10:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Láurico (C12:0)	0.2	0.2	0.2
Mirístico (C14:0)	1.1	1	1.1
Pentadecanoico (C15:0)	0.1	0.1	0.1
Palmítico (C16:0)	68.3	67.2	67.8
Palmítoleico (C16:1)	0.1	0.1	0.1
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	0.1	0.1
Estearico (C18:0)	5.2	5.4	5.3
Oleico (C18:1n9c)	19.4	20.1	19.8
Linoleico (C18:2n6c)	4.6	4.5	4.4
Linolénico (C18:3n3)	0.1	0.1	0.1
Araquídico (C20:0)	0.3	0.4	0.4
Eicosenoico (C20:1n9)	0.1	0.1	0.1
Behénico (C22:0)	0.1	0.1	0.1
Tricosanoico (C23:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Lignocérico (C24:0)	0.1	0.1	0.1

Tabla B2. Determinación cuantitativa de ácidos grasos presentes en el aceite de linaza

Ácidos grasos presentes en el aceite de linaza	Cantidad Relativa %		
	1 medición	2 medición	Promedio
Láurico (C12:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Mirístico (C14:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Pentadecanoico (C15:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Palmítico (C16:0)	5.4	5.3	5.4
Palmítoleico (C16:1)	0.1	0.1	0.1
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	0.1	0.1
Estearico (C18:0)	4.5	4.5	4.5
Oleico (C18:1n9c)	20.6	20.6	20.6
Linoleico (C18:2n6c)	16.6	16.6	16.6
Linolénico (C18:3n3)	48.1	48.2	48.2
Araquídico (C20:0)	0.2	0.2	0.2
Eicosenoico (C20:1n9)	0.2	0.2	0.2
Eicosadienoico (C20:2n6)	<0.1	<0.1	<0.1
Eicosatrienoico (C20:3n6)	<0.1	<0.1	<0.1
Eicosatrienoico (C20:3n3)	<0.1	<0.1	<0.1
Behénico (C22:0)	0.1	0.1	0.1
Tricosanoico (C23:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Lignocérico (C24:0)	0.1	0.1	0.1

Tabla B3. Determinación cuantitativa de ácidos grasos presentes en el aceite de oliva

Ácidos grasos presentes en el aceite de oliva	Cantidad Relativa %		
	1 medición	2 medición	Promedio
Mirístico (C:14)	<0.1	<0.1	<0.1
Pentadecanoico (C15:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Palmitico (C16:0)	12.3	12.1	12.2
Palmitoleico (C16:1)	1.3	1.3	1.3
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	0.1	0.1
Esteárico (C18:0)	2	2	2
Oleico (C18:1n9c)	70.6	71.2	70.9
Linoleico (C18:2n6c)	8.7	8.7	8.7
Linolénico (C18:3n3)	0.6	0.6	0.6
Araquídico (C20:0)	0.4	0.4	0.4
Eicosenoico (C20:1n9)	0.3	0.3	0.3
Heneicosanoico (C21:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Behénico (C22:0)	0.1	0.1	0.1
Tricosanoico (C23:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Lignocérico (C24:0)	0.1	0.1	0.1

Tabla B4. Determinación cuantitativa de ácidos grasos presentes en el aceite de girasol

Ácido grasos presentes en el aceite de girasol	Cantidad Relativa %		
	1 medición	2 medición	Promedio
Caprílico (C8:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Cáprico (C10:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Láurico (C12:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Mirístico (C14:0)	0.1	0.1	0.1
Pentadecanoico (C15:0)	<0.1	<0.1	<0.1
palmitico (C16:0)	5.5	5.7	5.6
palmitoleico (C16:1)	0.1	0.1	0.1
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	0.1	0.1
Esteárico (C18:0)	4.2	4.2	4.2
Oleico (C18:1n9c)	29.3	29.2	29.3
Linoleico (C18:2n6c)	58	57.2	57.6
Linolénico (C18:3n3)	0.1	0.1	0.1
Araquídico (C20:0)	0.3	0.3	0.3
Eicosenoico (C20:1n9)	0.2	0.2	0.2
Eicosadienoico (C20:2n6)	<0.1	<0.1	<0.1
Heneicosanoico (C21:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	<0.1	<0.1	<0.1
Behénico (C22:0)	0.8	0.7	0.8
Tricosanoico (C23:0)	<0.1	<0.1	<0.1

Tabla B5. Determinación cuantitativa de ácidos grasos presentes en el aceite sintético

Ácidos grasos presentes en el aceite sintético	Cantidad Relativa %		
	1 medición	2 medición	Promedio
Caprílico (C8:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Cáprico (C10:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Láurico (C12:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Mirístico (C14:0)	0.1	0.1	0.1
Pentadecanoico (C15:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Palmítico (C16:0)	6.8	7.2	7
Palmítoleico (C16:1)	0.1	0.1	0.1
Heptadecanoico (C17:0)	0.1	0.1	0.1
Esteárico (C18:0)	4.5	4.5	4.5
Oleico (C18:1n9c)	23.4	23.3	23.4
Linoleico (C18:2n6c)	26.6	26.6	26.6
Linolénico (C18:3n3)	34.2	34	34.1
Araquídico (C20:0)	0.2	0.2	0.2
Eicosenoico (C20:1n9)	0.2	0.2	0.2
Eicosadienoico (C20:2n6)	<0.1	<0.1	<0.1
Heneicosanoico (C21:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Eicosatrienoico (C20:3n6)	<0.1	<0.1	<0.1
Eicosatrienoico (C20:3n3)	<0.1	<0.1	<0.1
Behénico (C22:0)	0.3	0.3	0.3
Tricosanoico (C23:0)	<0.1	<0.1	<0.1
Lignocérico (C24:0)	0.1	0.1	0.1

## ANEXO C

### PLAN DE TRABAJO EXPERIMENTAL Determinación del peso molecular de una mezcla de aceites

La determinación del peso molecular de una muestra de mezcla de aceites vegetales, la cual simula el perfil lipídico de la microalga *Chlorella Vulgaris*, fue llevada a cabo en un reactor esférico de vidrio en el Laboratorio de Biomasa de la Universidad Industrial de Santander, encontrándose un valor de peso molecular de 1097.528 g/mol, el cual depende directamente del Índice de saponificación, 153.578 mg KOH/g aceite y del índice de acidez, 0.233 mg KOH/g aceite.

#### METODOLOGÍA

El peso molecular de la mezcla fue determinado mediante la metodología de Vicente et al, 2004 en donde el peso molecular,  $M = 16830 / (SV - AV)$ ; siendo SV, índice de saponificación y AV, índice de acidez. Ambos índices expresados en mg KOH/g aceite; El índice de acidez fue determinado mediante el Método Oficial AOCS Ca 5a-40 y el índice de saponificación mediante el Método Oficial AOCS Cd 6-38.

#### Determinación del índice de saponificación

El índice de saponificación tiene como objetivo determinar la cantidad de miligramos de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres que contiene el aceite y saponificar los esterés en 1 g de aceite. La determinación del índice de saponificación en ácidos grasos se realiza de acuerdo a lo indicado en el Método Oficial AOCS Cd 6-38. Para obtener resultados constantes, deben ser utilizadas pipetas de 50 ml calibradas, y su flujo de salida debe mantenerse durante un tiempo específico. Algunos ejemplos pueden dar una solución de color oscuro, por lo tanto, para permitir la detección de un punto final satisfactorio se utiliza un tamaño de muestra más pequeña, alrededor de 1 g.

La precisión de este procedimiento indica que dos determinaciones realizadas en un solo laboratorio no deben diferir en más de 3,2 unidades, y de dos determinaciones individuales realizadas en diferentes laboratorios no deben diferir en más de 6,4 unidades.

Para el desarrollo de este método es necesario contar con al menos 100 ml de KOH alcohólico, por lo tanto será la primera solución a preparar.

### ***Preparación de KOH alcohólico***

Materiales:

Balanza, espátula, vidrio de reloj, plancha de calentamiento, termómetro, erlenmeyer de 250 mL, balón de 1L, condensador de aire (mínimo 65 cm de largo para el reflujo), boquilla para destilar.

Reactivos:

- KOH
- Alcohol Etílico

Procedimiento:

1. Pesar 1.25 g de KOH en un vidrio de reloj.
2. Transferir el KOH a un balón de 1000 ml completamente seco.
3. Añadir 250 mL de alcohol etílico al balón.
4. Ubicar el balón sobre una plancha de calentamiento y con ayuda de un soporte acondicionar al sistema un condensador, instalando las 2 mangueras requeridas recordando que la manguera que proporciona el agua siempre se instala en el nivel inferior. Se debe asegurar la fijación de las mangueras a las entradas y salidas del sistema; si es necesario se utilizará una abrazadera en la fuente de agua.
5. Someter el balón a calentamiento sin permitirle sobrepasar una temperatura de 70°C, dejando fluir agua al condensador. El sistema se mantendrá en las condiciones mencionadas durante 60 minutos.
6. Pasados los 60 minutos instalar la boquilla de destilación y recoger el alcohol en un recipiente limpio de vidrio con tapón.
7. Sobre el alcohol recogido disolver 4g de KOH por 0.1 L de alcohol destilado. La muestra recolectada debe ser refrigerada para mantener la temperatura igual o inferior a 15°C. Esta solución debe quedar clara. Cabe recordar que se necesitarán dos muestras de 50 ml para cada corrida, las cuales corresponderán a la muestra que acompañará el aceite a analizar y el 'blanco' de comparación que se utilizará en el método.

Luego de tener el KOH alcohólico se procede a preparar dos montajes simultáneos tal como se muestra en la Figura 1.

Materiales:

Balanza, 2 balones de 1L espátula, vidrio de reloj, plancha de calentamiento, termómetro, vaso de precipitados de 50 mL, erlenmeyer de 250 mL, pipeta de 50

mL, chips de ebullición, condensador, bureta de 50 mL, vaso de precipitados de 250 mL, frasco lavador.

#### Reactivos:

- Ácido clorhídrico, 0,5 N, estandarizado. Ver sección estandarización de soluciones. Se recomienda estandarizar mínimo 250 mL los cuales serán utilizado para titular las soluciones.
- 100 mL solución alcohólica de hidróxido de potasio (50 mL para cada balón).
- 50 mL de tolueno (25 mL para cada balón)
- Agua destilada
- 2 mL de Solución de fenolftaleína (1 mL para cada balón)

#### Procedimiento:

1. Pesar 2.5 g de la muestra de aceite en un vaso de precipitados de 50 mL.
2. Calentar la muestra de aceite sobre una plancha a 100°C, controlando la temperatura con termómetro hasta que se homogenice completamente.
3. Pesar  $2 \pm 0,0001$  g de la muestra fundida en un vaso de 50 ml y agregarla al balón. Se debe tener en cuenta que aprox. 0.2 g de la muestra se quedan depositados en las paredes del vaso.
4. Ubicar dos balones sobre planchas de calentamiento, instalando los correspondientes condensadores y conectar las mangueras de manera que se acoplen simultáneamente los sistemas (blanco y muestra con el aceite a analizar) tal como se muestra en la Figura 1.
5. Añadir 25 mL de tolueno a cada balón y calentar suavemente hasta disolver la muestra.
6. Añadir 50 mL de la solución alcohólica con una pipeta a cada balón.
7. Añadir varios chips de ebullición y dejar circular el agua por los condensadores. Calentar lentamente dejando hervir hasta que la muestra este completamente saponificada. Esto usualmente requiere alrededor de 1 hora para las muestras normales. Se debe evitar que el anillo de vapor en el condensador llegue a la parte superior del condensador, o pueden generarse pérdidas.
8. Finalizada la saponificación dejar enfriar el sistema evitando la formación de gelatina. Lavar el interior del condensador con 25 mL de agua destilada, permitiendo la entrada del agua de lavado al balón.
9. Desconectar el sistema de refrigeración.
10. Añadir alrededor de 1 mL de fenolftaleína a cada balón.
11. Valorar cada muestra con HCl 0,5 N hasta decoloración del color rosa.
12. Anotar el volumen de 0,5 N HCl necesario para las titulaciones.
13. Calcular el Índice de saponificación mediante la ecuación:

$$SV = \frac{[(B - S) * N]}{W * 56.1}$$

donde,

B = mL de 0,5 N HCl necesarios para valorar en blanco

S = mL de 0,5 N HCl necesarios para valorar la muestra

N = normalidad de la solución de HCl

W = peso de la muestra en gramos

### **Determinación del índice de acidez**

La determinación del índice de acidez en ácidos grasos se realiza de acuerdo a lo indicado en el Método Oficial AOCS Ca 5a-40. El índice de acidez representa los ácidos grasos libres presentes en la muestra, es decir los ácidos que no se encuentran ligados a las moléculas de glicerol. Este método en especial es aplicable a todos los aceites vegetales crudos, refinados, marinos y animales. Los ácidos grasos libres son frecuentemente expresados en términos de índice de acidez en vez del porcentaje de ácidos grasos libres. El índice de acidez es definido como el número de miligramos de KOH necesarios para neutralizar 1 g de muestra.

El porcentaje de ácidos grasos libres en la mayoría de grasas y aceites es calculado como ácido oléico, aunque en aceites de coco es frecuentemente expresado como ácido láurico y en aceite de palma como ácido palmítico.

$$\% \text{ Ácidos Grasos libres como oleico} = \frac{\text{mL de álcali} \times N \times 28.2}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\% \text{ Ácidos Grasos libres como laurico} = \frac{\text{mL de álcali} \times N \times 20.0}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\% \text{ Ácidos Grasos libres como Palmitico} = \frac{\text{mL de álcali} \times N \times 25.6}{\text{peso de la muestra}}$$

Para convertir el porcentaje de ácidos grasos libres (como oléico) a índice de acidez se debe multiplicar el porcentaje de ácidos grasos libres por 1.99. Para el desarrollo de este método es necesario contar con al menos 500 mL de soluciones estandarizadas de NaOH y HCl, por lo tanto es primordial conocer el procedimiento para la estandarización de soluciones.

### **Estandarización de soluciones**

Para preparar una disolución de una determinada concentración (por ejemplo 0.1 N) se parte de ácido clorhídrico al 37%, se disuelve un volumen conocido en agua destilada y se diluye a un volumen conocido, esta disolución solo será aproximadamente 0.1 N, por lo que es necesario estandarizarla para conocer exactamente su concentración.

Materiales: Soporte, pinzas, bureta de 50 mL, pipeta de 20 mL, pera para pipetas, erlenmeyer de 100 mL.

Reactivos:

- Solución patrón de NaOH X N.
- Solución de HCl 0.5 N
- Solución de HCl 0.1 N
- Solución de NaOH 0.1 N
- Fenolftaleína
- Agua destilada

**Nota:** La preparación de las soluciones de concentración conocida se basa en medir una cantidad específica de compuesto y diluir en un matraz aforado.

Procedimiento

1. Medir 20 mL de la solución de HCl 0.5 N a estandarizar con una pipeta para luego depositarla en un erlenmeyer.
2. Añadir de 2 a 3 gotas de fenolftaleína a la solución.
3. Valorar con la solución de X N de NaOH hasta que vire ( color rosa )
4. Anotar el volumen gastado y calcular la N de la solución mediante la relación :

$$V_a * N_a = V_b * C_b$$

Siendo a: HCl y b:NaOH

Para estandarizar las soluciones de NaOH se desarrolla el proceso inverso teniendo en cuenta que la fenolftaleína vira a rosado en condiciones básicas.

1. Medir 20 ml de la solución de NaOH 0.1 N a estandarizar con una pipeta, luego depositarla en un Erlenmeyer.
2. Añadir de 2 a 3 gotas de fenolftaleína a la solución
3. Valorar con la solución de N de NaOH hasta que vire ( color blanco )

4. Anotar el volumen gastado y calcular la N de la solución de acuerdo a la relación expuesta anteriormente.

Luego de preparar la solución estandarizada se procede a desarrollar el método:

Materiales:

Soporte, pinzas, Bureta de 50 ml, pipeta de 20 ml, pera, Erlenmeyer de 100 ml.

Reactivos:

- Alcohol etílico al 95%. El alcohol debe ser neutralizado en presencia de fenolftaleína con álcali hasta un color permanente rosa pálido justo antes de ser usado.
- Fenolftaleína
- Solución estandarizada de hidróxido de sodio 0.1 N.

Procedimiento:

1. La muestra debe estar bien mezclada y completamente líquida antes del pesaje, no calentar la muestra a más de 10°C del punto de fusión.

*Tabla D1. Rango de ácidos grasos libres, volumen de alcohol y concentración del álcali*

%FAME	Muestra (g)	Alcohol (mL)	Concentración del Álcali
0.00 a 0.2	56.4 ± 0.2	50	0.1 N
0.2 a 1.0	28.2 ± 0.2	50	0.1 N
1.0 a 30.0	7.05 ± 0.05	75	0.25 N
30.0 a 50.0	7.05 ± 0.05	100	0.25 o 1.0 N
50.0 a 100	3.525 ± 0.001	100	1.0 N

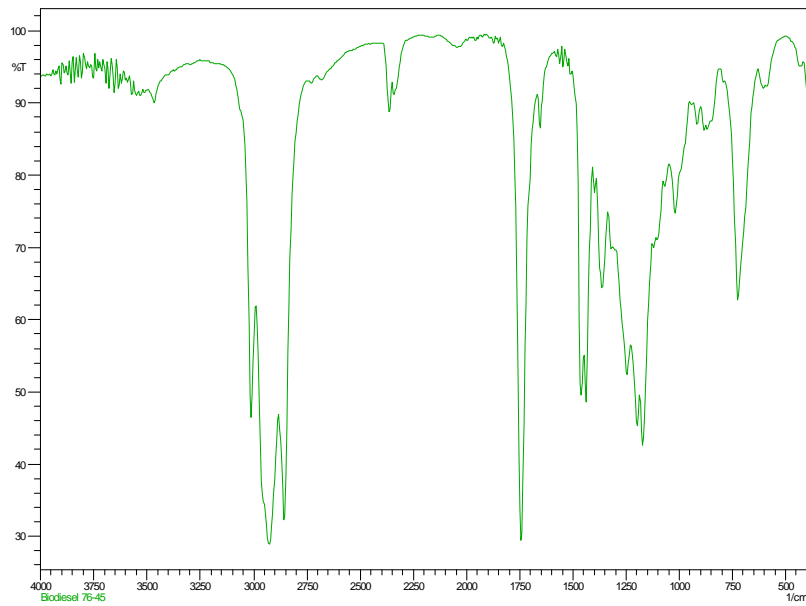
2. Utilice la tabla 1 para determinar el peso de la muestra para varios rangos de ácidos grasos, pese la cantidad designada en un Erlenmeyer de 200 ml
3. Añadir la cantidad especificada de alcohol neutralizado y 2 ml del indicador de fenolftaleína.
4. Valorar con el hidróxido de sodio estandarizado, agitar enérgicamente hasta que este se torne color rosa permanente de la misma intensidad que el alcohol neutralizado antes de la adición de la muestra. el color debe permanecer por 30 segundos.
5. Calcular el porcentaje de ácidos grasos de acuerdo a

$$\% \text{ Ácidos Grasos libres como oleico} = \frac{\text{mL de álcali} \times N \times 28.2}{\text{peso de la muestra}}$$

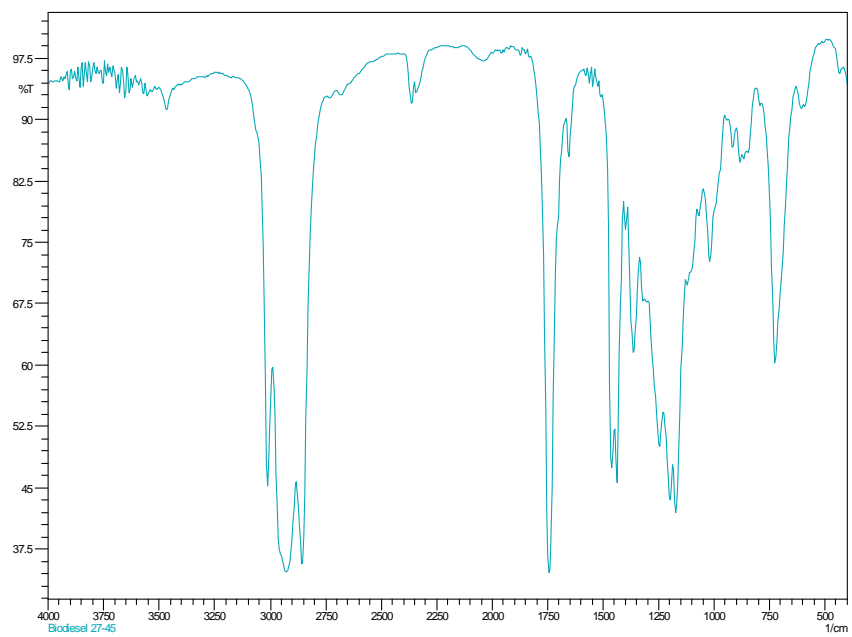
## ANEXO D

**Graficas que muestran el espectro infrarrojo característico de cada prueba.**

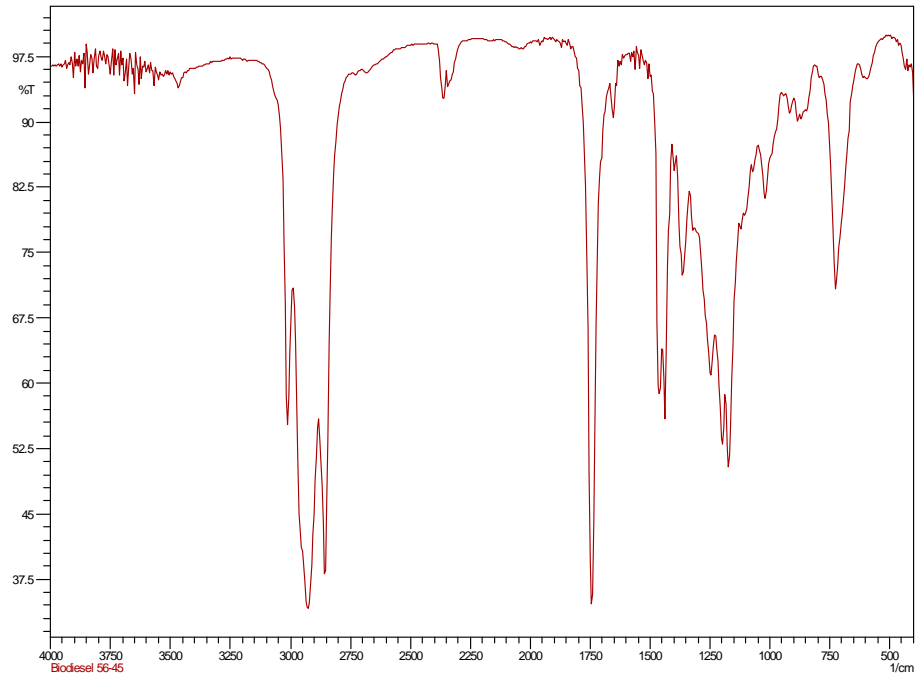
Espectro infrarrojo para la prueba 1



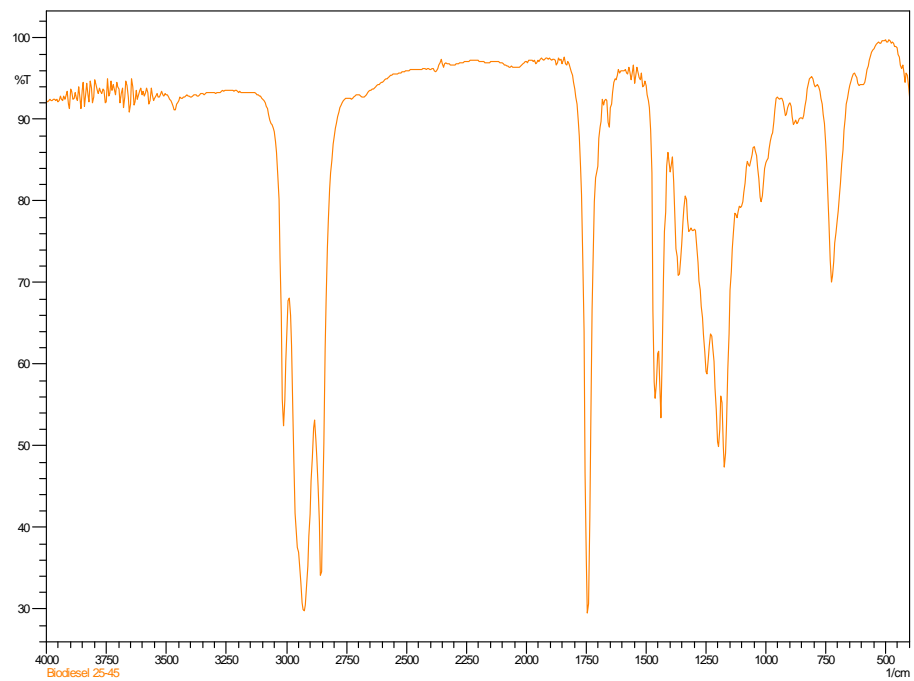
Espectro infrarrojo para la prueba 2



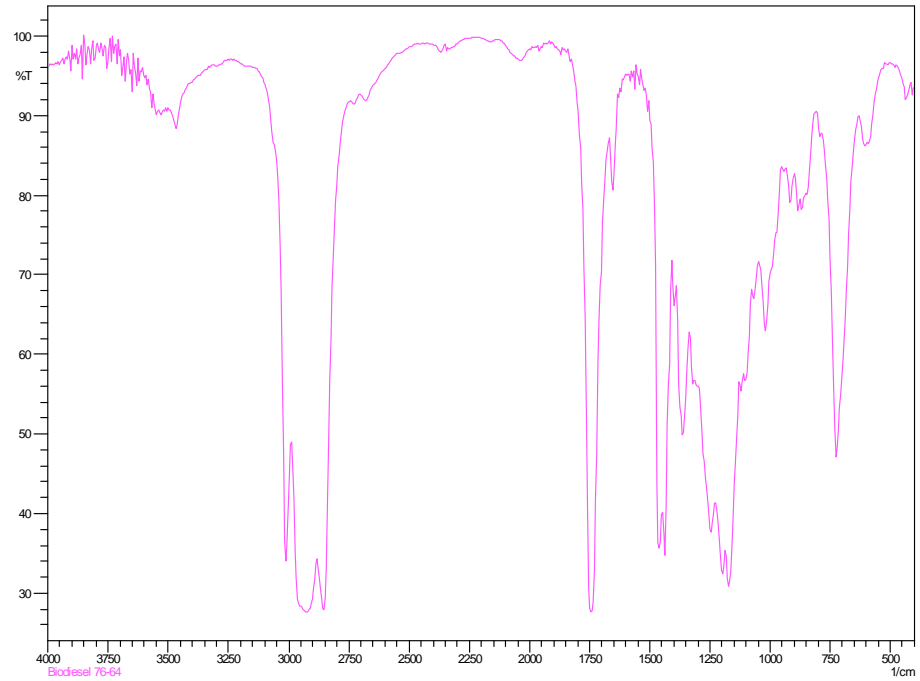
Espectro infrarrojo para la prueba 3



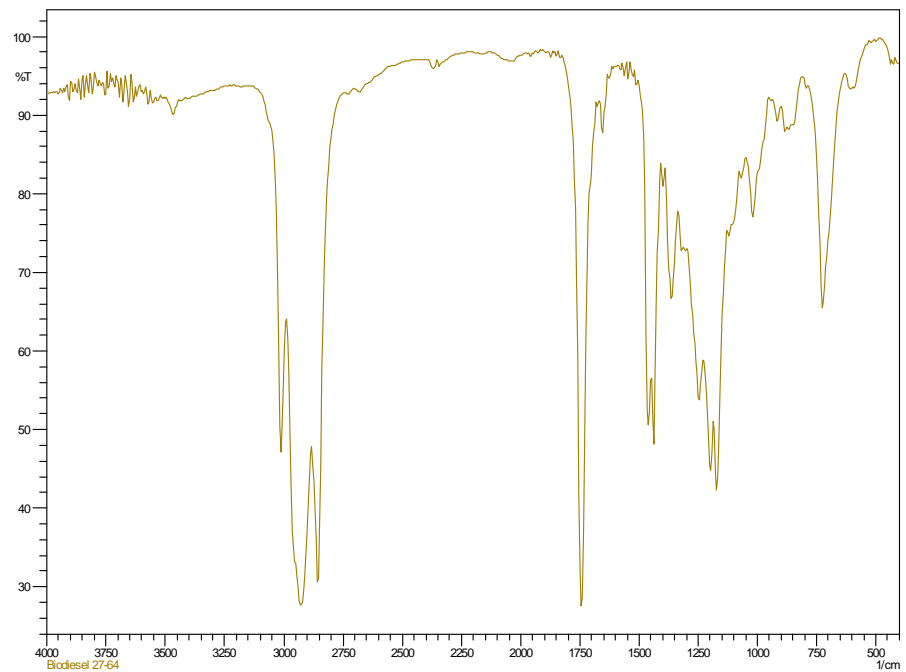
Espectro infrarrojo para la prueba 4.



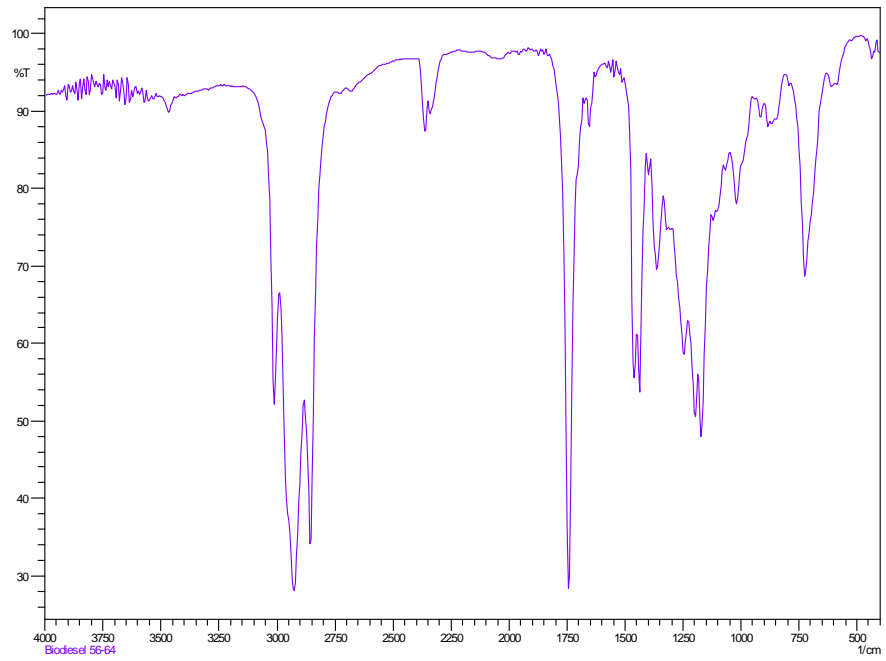
Espectro infrarrojo para la prueba 5.



Espectro infrarrojo para la prueba 6.



### Espectro infrarrojo para la prueba 7



### Espectro infrarrojo para la prueba 8.

