

**TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE HIGUERILLA
USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE *THERMOMYCES LANUGINOSUS*.**

**SANDRA MILENA HERNÁNDEZ SUÁREZ
DANIEL EDUARDO MÉNDEZ CASTRO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE HIGUERILLA
USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE *THERMOMYCES LANUGINOSUS*.**

**SANDRA MILENA HERNÁNDEZ SUÁREZ
DANIEL EDUARDO MÉNDEZ CASTRO**

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

**Directora
Janeth Aidé Perea Villamil
Química, MSc. Doctora en Química**

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, CICTA, por toda la colaboración prestada para la ejecución de este proyecto.

A la Doctora Janeth Aidé Perea por el tiempo e interés dedicado al desarrollo de este proyecto.

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

Al Señor Julio Cesar Pérez por facilitarnos el equipo y las instalaciones para el desarrollo del análisis cromatográfico.

A la empresa Santandereana C.I SACEITES S.A por aportar parte de los materiales requeridos para este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, institución que nos abrió las puertas del conocimiento.

A nuestros padres, amigos y compañeros, soporte invaluable para culminar este proceso.

DEDICATORIA

A los amores de mi vida, Miguel, Edy, Feny y Mitu que con el amor que Dios nos regaló como familia, han hecho que crezca cada día.

Sandra Milena Hernández Suárez.

A mi mamá, por su apoyo incondicional y su infinita capacidad de sacrificio.

A las personas que han sido luz en el camino.

Daniel Eduardo Méndez C.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 LA HIGUERILLA	4
1.2 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL	7
1.3 REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS	10
2. ANTECEDENTES	14
2.1 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE HIGUERILLA	15
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	18
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	18
3.2 MÉTODO DE ANÁLISIS	18
3.2.1 Evaluación de las restricciones de difusión	20
3.3 REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS	20
3.3.1 Evaluación de las variables de estudio	22
3.3.2 Evaluación de las condiciones óptimas de reacción	23
3.4 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA	24
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
4.2 EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DIFUSIONALES	26
4.3 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN	27
4.4 ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA Y REUSO	37
4.5 PRODUCTIVIDAD DE LA ALCOHÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE HIGUERILLA	39
5. CONCLUSIONES	43
6. RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ácido Ricinoléico.	6
Figura 2. Reacción general para la transesterificación de triacilglicéridos.	9
Figura 3. Reacción de alcoholisis de un triacilglicerol genérico para la producción de alquil ésteres de ácidos grasos.	10
Figura 4. Montaje utilizado para llevar a cabo la reacción de alcoholisis.	21
Figura 5. Porcentaje etil ésteres versus tiempo para dos velocidades de agitación.	27
Figura 6. Rendimiento de la reacción como función de las variables independientes.	29
Figura 7. Diagrama de Pareto para el porcentaje de etil ésteres.	32
Figura 8. Superficie de respuesta para el porcentaje de etil ésteres con la temperatura constante en su valor central.	33
Figura 9. Superficie de respuesta para el porcentaje de etil ésteres con la relación de sustratos constante en su valor central.	34
Figura 10. Superficie de respuesta para el porcentaje de etil ésteres con el tiempo de reacción constante en su valor central.	35
Figura 11. Superficies de respuesta para el grado de optimización con la relación de sustratos óptima.	37
Figura 12. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM en las condiciones óptimas de producción.	38

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Característica del aceite de higuera dependiendo de su extracción.	5
Tabla 2. Composición del Aceite de Higuera.	5
Tabla 3. Algunas reacciones del ácido ricinoléico.	6
Tabla 4. Algunos aceites usados en estudios de producción de biodiesel.	7
Tabla 5. Características de la lipasa Lipozyme TL, IM.	18
Tabla 6. Código de los niveles del diseño experimental.	22
Tabla 7. Puntos del diseño experimental.	23
Tabla 8. Índice de acidez del sustrato usado en reacción y pretratamiento.	25
Tabla 9. Índice de acidez del biodiesel de la reacción modelo de máxima producción de etil ésteres.	25
Tabla 10. Porcentaje de etil ésteres según la velocidad de agitación en el transcurso del tiempo de la reacción.	26
Tabla 11. Rendimiento de la reacción según el resultado del diseño experimental.	28
Tabla 12. Análisis de varianza para el porcentaje de etil ésteres.	30
Tabla 13. Efectos estimados para el porcentaje de etil ésteres.	31
Tabla 14. Respuesta Optimizada de acuerdo al modelo establecido por $2^3 +$ estrella.	36
Tabla 15. Validación del modelo ajustado.	37
Tabla 16. Condiciones óptimas finales y comparación con otros trabajos que utilizan Lipozyme TL, IM.	41
Tabla 17. Comparación de resultados de la transesterificación del aceite de higuera.	42

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Perfil cromatográfico del producto de la reacción de alcoholisis en condiciones óptimas (97,48% de etil ésteres).	53

RESUMEN

TÍTULO

TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE HIGUERILLA USANDO LIPASA INMOVILIZADA DE *THERMOMYCES LANUGINOSUS*.*

AUTORES

Hernández Suárez, Sandra Milena. Méndez Castro, Daniel Eduardo.**

PALABRAS CLAVES

Alcoholisis, aceite de higuera, ésteres alquílicos, biodiesel, lipasa inmovilizada, diseño experimental.

DESCRIPCIÓN

El aceite de higuera es una materia prima alternativa renovable para la producción de diversos oleoquímicos, dentro de los cuales se encuentran los ésteres alquílicos. En la obtención de ésteres por transesterificación de aceites vegetales es frecuente el uso de catalizadores químicos. Estos métodos presentan dificultades en la recuperación del glicerol y la remoción del catalizador, además requieren condiciones fuertes de operación. El uso de lipasas como catalizadores enzimáticos se muestra como una opción viable para la alcoholisis de aceites vegetales, además permite superar algunos de los problemas mencionados anteriormente.

En este trabajo se estudió la obtención de alquil ésteres a partir del aceite de higuera usando lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus* como catalizador. Se evaluaron las principales variables que afectan la reacción de alcoholisis, y se determinaron las condiciones con las cuales fue posible obtener el máximo rendimiento de la reacción aplicando un diseño experimental, basado en un diseño central compuesto rotatorio de 2^3 + estrella, analizado por metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico Statgraphics centurión XV. Finalmente se evaluó la estabilidad operativa de la enzima.

Se encontró que usando un 9% de enzima respecto al peso del aceite, agitación de 150 rpm, temperatura de 53.4 °C, relación molar aceite/etanol 1:4,8 y un tiempo de reacción de 3.7 horas se alcanzó un rendimiento en la reacción de 97.48%. Este porcentaje se logró con mínima contribución de subproductos y en condiciones suaves de operación.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

*** Directora: Janeth Aidé Perea Villamil.

SUMMARY

TITLE

ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF CASTOR OIL USING IMMOBILIZED LIPASE OF *THERMOMYCES LANUGINOSUS*.*

AUTHORS

Hernández Suárez, Sandra Milena. Méndez Castro, Daniel Eduardo.**

KEY WORDS

Alcoholysis, castor oil, fatty acid alkyl esters, biodiesel, immobilized lipase, experimental design.

DESCRIPTION

Castor oil is a renewable raw material for the production of a variety of oleochemicals, among them the alkyl esters. For the obtaining of these compounds by transesterification of vegetable oils, chemical catalysis are frequently used. These methods present difficulties for glycerol recovery and the removal of the catalyst, besides they need strong operating conditions. The use of lipases as enzymatical catalyst appears as a good option for the alcoholysis of vegetable oils, in addition it allows to overcome some of the problems mentioned above.

In this work, it was studied the obtaining of alkyl esters from castor oil using immobilized lipase of *Thermomyces lanuginosus* as catalyst. There were evaluated the principal variables that affect alcoholysis reaction, conditions which allow to achieved maximum yield were determined by applying an experimental design based on a central composite design 2^3 + star, it was analyzed by response surface methodology with aid of the statistical software, Statgraphics centurion XV. Finally, it was evaluated the enzyme's operative stability.

It was found that using 9% of enzyme with respect to oil weight, a stirring rate of 150 rpm, a temperature of 53,4 °C and a molar ratio oil:alcohol of 1:4,8, with a reaction time of 3,7 hours, it can be reached a reaction yield of 97,48%. This value was reached with minimal contribution of by-products and in soft operating conditions.

* Work of degree.

** Faculty of Sciences. School of Chemistry.

*** Director: Janeth Aidé Perea Villamil.

INTRODUCCIÓN

Reconociendo el panorama socio-económico del país, la globalización y los múltiples tratados comerciales, se hace evidente la necesidad de desarrollar proyectos de investigación que promuevan opciones que de forma directa afecten positivamente el agro nacional. Entonces, la higuera se presenta como una alternativa renovable a partir de la cual se pueden desarrollar materias primas sustitutas para el petróleo.

El cultivo de higuera requiere poca inversión y tiene buenas proyecciones de comercialización. La extracción mecánica del aceite de las semillas muestra alto rendimiento y su uso es principalmente industrial como consecuencia de ser no comestible, característica que cobra importancia frente a la actual discusión sobre los biocombustibles y la afectación al sector alimentario. Ésta discusión encuentra sus causas principalmente en la desviación de los productos agrícolas hacia el sector energético y el uso cuestionable del terreno cultivable, de las fuentes hídricas y de los fondos estatales. En Colombia el aceite de higuera no se produce a escala industrial y las investigaciones respecto a su modificación utilizando enzimas son escasas.

Actualmente los aceites provenientes de fuentes renovables son una alternativa al combustible diesel, pero en su forma natural generan dificultades técnicas que hacen necesaria la modificación de sus propiedades. Dentro de los métodos usados para lograr este objetivo se encuentran la producción de alquil ésteres por procesos como pirólisis, cracking catalítico y alcoholisis. De estas opciones, la alcoholisis se muestra como la mejor opción [Fukuda y col., 2001].

Los alquil ésteres de ácidos grasos producidos a partir de aceites vegetales son importantes intermediarios en la oleoquímica y en la síntesis de un amplio rango de productos usados en la industria de lubricantes, surfactantes, carburantes,

solventes, de productos especializados como fluidos hidráulicos y perforantes, poliésteres biodegradables, agentes dispersantes, cosméticos y como biodiesel [Dossat y col., 2002].

El biodiesel (alquil ésteres de ácidos grasos) es producido por alcoholisis de aceites vegetales o grasas animales y alcoholes de cadena corta tales como metanol, etanol, propanol o alcohol amílico. Dentro de las principales ventajas del biodiesel se encuentra que es renovable, biodegradable, y ofrece solución al problema de las emisiones de óxidos de azufre, monóxido de carbono, hidrocarburos, hollín, materia particulada y óxidos de nitrógeno [Fukuda y col., 2001].

En la actualidad se usan métodos químicos para la producción de biodiesel que brindan una alta conversión de triacilglicerol en sus correspondientes alquil ésteres. Estos métodos presentan desventajas tales como la dificultad en la recuperación del glicerol, la necesidad de remover el catalizador y la cantidad de energía requerida para el proceso. Muchas investigaciones reportan que las lipasas como catalizadores enzimáticos resultan efectivas en el proceso de alcoholisis de aceites [Varma y Madras, 2007]. Los métodos enzimáticos pueden superar los problemas mencionados pero no han sido implementados a nivel industrial debido al precio y condiciones de estabilidad de las enzimas en el trabajo a gran escala [Xu y col., 2003]. Los principales beneficios ofrecidos por las enzimas son la especificidad, condiciones suaves de reacción y disminución en la producción de desechos.

Una vez conocidas las ventajas que ofrecen los derivados oleoquímicos del aceite de higuera se busca determinar un buen rendimiento en el proceso de transformación de dicho aceite, cuidando de forma simultánea el impacto que esta transformación pueda causar en el ambiente.

Este proyecto evaluó una ruta alternativa para la obtención de ésteres alquílicos por vía enzimática a partir del aceite de higuera como materia prima renovable y alcohol etílico, utilizando como catalizador la lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus* Lipozyme TL, IM. Se buscaron las mejores condiciones para realizar el proceso en un sistema discontinuo libre de solvente y alcanzar altos niveles de producción.

Los resultados obtenidos del mismo, además de profundizar en el conocimiento del comportamiento de la enzima en una matriz de reacción específica, brindan respaldo para un futuro proceso de producción de ésteres alquílicos a gran escala que le dará un valor agregado al aceite de higuera e impulsará la comercialización masiva de sus derivados favoreciendo el consumo interno y creando nuevas fuentes de ingreso.

La investigación desarrollada a través del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA), acompaña el creciente desarrollo e interés en el área de la oleoquímica adaptando el uso de nuevas tecnologías, procesos más económicos, trabajo en condiciones suaves, tecnología limpia y disminución de residuos contaminantes.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LA HIGUERILLA.

La higuera (*Ricinus communis L*) es un arbusto de la familia de euforbiáceas de crecimiento rápido. En estado silvestre puede alcanzar diez metros de altura mientras que en cultivo es un arbusto que apenas llega a los cuatro metros. Tiene gran capacidad de adaptación y hoy día es cultivada prácticamente en todas las regiones tropicales y subtropicales, aunque es típica de regiones semiáridas. Su origen es muy discutido y algunos la consideran originaria de Asia y otros como nativa de América, pero se cree que África es su cuna. En la producción, India contribuye con el 70% del aceite de higuera, el resto es producido por China, Brasil, Tailandia y algunos países africanos [Conceição y col., 2007].

El aceite de higuera es la única fuente comercial de ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-cis-9-octadecenoico; $C_{18}H_{34}O_3$) en una proporción cercana al 90%. El aceite de higuera es obtenido de las semillas con un rendimiento del 50%. No es comestible, es insoluble en agua, químicamente estable, completamente biodegradable y ampliamente usado en aplicaciones oleoquímicas [Cvengros y col. 2006].

En la actualidad el uso industrial del aceite abarca la fabricación de explosivos, tintas, pinturas, lacas, barnices, pegamento, plásticos, fertilizantes, velas, cosméticos, lubricantes, industria de motores de alta revolución, para uso anti-parasitario en humanos, etc. El uso como insumo en unas 700 aplicaciones le asegura al aceite de higuera un mercado internacional.

Las propiedades del aceite varían con el método de extracción (tabla 1). Generalmente presenta bajo índice de acidez, bajo índice de yodo y un valor de saponificación ligeramente más alto cuando es extraído a altas temperaturas y

bajas presiones así como un color más claro que cuando es extraído con solventes.

Entre los métodos de extracción se destacan por presión mecánica, extracción con solventes y combinación de ambos. El aceite obtenido por presión mecánica es de color claro y no contiene ácidos grasos libres. Por este método solo es posible obtener el 45% del aceite mientras que el aceite remanente en la torta puede ser extraído con solventes en un extractor Soxhlet con heptano, hexano o éter de petróleo.

Tabla 1. Característica del aceite de higuera dependiendo de su extracción.

Propiedades	Aceite prensado en frío	Aceite extraído con solvente	Aceite deshidratado
Gravedad específica	0.961-0.963	0.957-0.963	0.926-0.937
Índice de acidez.	3	10	6
Índice de yodo.	82-88	80-88	125-145
Índice de saponificación.	179-185	177-182	185-188

La composición de acilgliceroles en el aceite expresada en porcentaje molar es: triricinoleína 68,2%, diricinoleína 28%, monoricinoleína 2,9% y no ricinoleicas 0,9%. En la tabla 2 se presenta la composición en ácidos grasos del aceite.

Tabla 2. Composición del Aceite de Higuera.

Ácidos Grasos	Composición (%)
Ricínolico	90.2
Linoleico.	4.4
Oleico.	2.8
Esteárico.	0.9
Palmítico.	0.7
Dihidroxiesteárico.	0.5
Licosanoico.	0.3
Linolénico.	0.2

La diferencia entre el aceite de higuera y los otros aceites vegetales se atribuye principalmente al grupo hidroxilo del ácido ricinoléico (figura 1), su principal constituyente. Este ácido es muy reactivo y presenta tres grupos funcionales activos: (1) un grupo carboxilo susceptible al proceso de esterificación; (2) un único punto de insaturación el cual puede ser modificado por hidrogenación, epoxidación o vulcanización, y (3) el grupo hidroxilo el cual puede ser acetilado o alcoxlado, o removido por deshidratación para incrementar la insaturación del compuesto [Ogunniyi, 2006]. En la tabla 3, se relacionan las principales reacciones que se pueden dar con el aceite de higuera.

Figura 1. Ácido Ricinoléico.

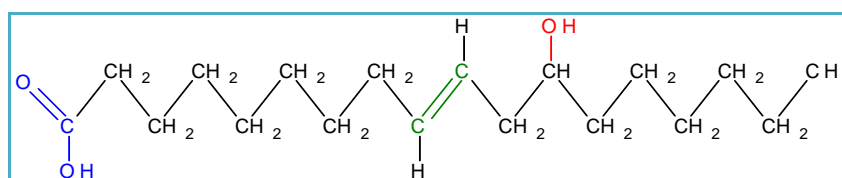


Tabla 3. Algunas reacciones del ácido ricinoléico.

	Naturaleza de la reacción	Reactivos adicionados	Productos
Reacciones que ocurren por el enlace Ester del ácido ricinoléico.			
Enlace Ester	Hidrólisis	Ácido, enzima o reactivo Twitchell	Ácidos grasos, glicerol
	Esterificación	Alcoholes monohídricos	Esteres
	Alcoholisis	Glicerol, glicoles, pentaerythritol, etc.	Mono y diglicéridos, monoglicoles, etc.
	Saponificación	Álcalis, álcalis mas sales metálicas.	Jabones solubles y jabones insolubles
	Reducción	Na	Alcoholes
	Amidación	Alquilamidas, alcanolaminas, etc.	Amidas y sales de aminas
	Halogenación	SOCl ₂	Ácidos grasos halogenados
Reacciones que ocurren por el enlace doble C del ácido ricinoléico			
Doble enlace	Oxidación, polimerización	Calor, oxígeno, agente crosslink	Aceites polimerizados
	Hidrogenación	Hidrógeno (presión moderada)	Hidroxiestearatos
	Epoxidación	Peróxido de hidrógeno	Aceites epoxidizados
	Halogenación	Cl ₂ , Br ₂ , I ₂	Aceites halogenados
	Reacciones de adición Sulfonación	S, ácido maleico H ₂ SO ₄	Aceite polimerizados Aceites sulfonados

Reacciones que ocurren por el grupo hidroxilo del ácido ricinoléico

Grupo hidroxilo	Deshidratación, hidrólisis, destilación	Catalizadores (altas temperaturas)	Aceite higuierilla deshidratado, ácido octadecadienoico
	Fusión cáustica	NaOH	Ácido sebacoico, alcohol caprílico
	Pirólisis	Alta temperatura	Ácido undecilenoico, heptaldehído
	Halogenación	PCl ₅ , POCl ₃	Aceites halogenados
	Alcoxilación	Etileno y/o óxido de propileno	Aceites alcoxilados
	Esterificación	Anhídridos acético, fosfórico, maléico, ftálico	Alquil y alquilaril ésteres, fosfato ésteres
	Sulfatación	H ₂ SO ₄	Aceite de Higuierilla sulfatado (aceite turco rojo)
	Reacciones uretano	Isocianatos.	Polímeros de uretano

1.2 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

El alto precio del petróleo y el incremento del daño ambiental justifican el interés por los aceites vegetales como fuentes alternativas de energía [Salis y col., 2007]. En la tabla 4 se relacionan algunos de los estudios de transformación de aceites para la producción de Biodiesel.

Tabla 4. Algunos aceites usados en estudios de producción de biodiesel.

TIPO DE ACEITE	AUTORES
Colza	Nelson y col., 1996
Oliva	Nelson y col., 1996; Orçaire y col., 2006
Girasol	Nelson y col., 1996; Selmi y Thomas, 1998; Ma y Hanna, 1999; Iso y col., 2001; Dossat y col., 2002; Soumanou y Bornscheuer, 2003; Al-Zuhair y col., 200; Modi y col., 2006, Mittlebach, 1990; Bélafi-Bakó y col., 2002; Yesiloglu, 2004; Tuter y col., 2004
Mezcla de soya y colza	Shimada y col., 1999
Soya	Nelson y col., 1996; Ma y Hanna, 1999; Shimada y col., 1999; Fukuda y col., 2001; Chen y Wu, 2003; Shieh y col., 2003; Du y col., 2003; Noureddini y col., 2005; Kaieda y col., 2001; Samukawa y col., 2000; Xu y col., 2004, Watanabe y col., 2002

Palmiste	Abigor y col., 2000; Oliveira y Oliveira, 2001; Nandi y col., 2005; Castellanos y González, 2004; Amado y Rodríguez 2007
Semilla de algodón	Köse y col., 2002; Soumanou y Bornscheuer, 2003; Orçaire y col., 2006
Palma	Al-Zuhair y col., 2003
Jatropha	Sha y col., 2004; Modi y col., 2006
Coco	Nandi y col., 2005
Fritura usado	Wu y col., 2003; Zheng y col., 2005
Cera de jojoba	Canoira y col., 2006
Karanj	Modi y col., 2006
Salicornia	Desai y col., 2006
Higuerilla	Mukesh, 1993; De Oliveira y col., 2004; Meneghetti y col., 2006; Benavides y col., 2007; Varma y Madras, 2007
Linaza	Varma y Madras, 2007

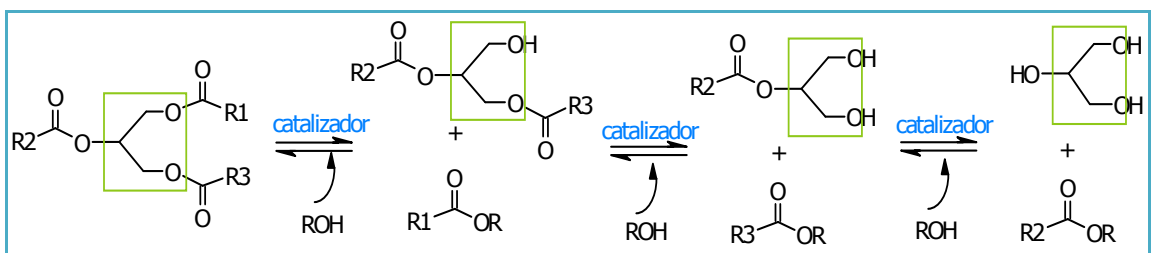
Estos aceites no son usados directamente en motores diesel porque presentan problemas de alta viscosidad, composición ácida y ácidos grasos libres, formación de gomas debido a la oxidación y depósitos de carbón, por lo que se han desarrollado alternativas para encontrar derivados cuyas propiedades se acerquen a las mostradas por los combustibles derivados del petróleo. Estas alternativas incluyen el uso de microemulsiones, pirólisis, cracking catalítico, fluidos supercríticos y transesterificación. De éstas, la transesterificación es la mejor opción [Varma y Madras, 2007].

La transesterificación es un término usado para describir un importante conjunto de reacciones orgánicas de las cuales se obtiene la transformación de un éster en otro por intercambio de grupos acilo. La reacción puede ocurrir entre triacilglicerol (interesterificación), un triacilglicerol y un alcohol (alcoholólisis), o entre un triacilglicerol y un ácido graso (acidólisis) [Fukuda y col., 2001].

Las reacciones mencionadas pueden llevarse a cabo en presencia de un catalizador químico o un biocatalizador. De ésta forma, la alcoholólisis por catálisis química, de uso extendido, se realiza con ácidos o bases, brindando buen rendimiento de producción de alquil ésteres. La conversión enzimática de triacilglicérol se desarrolla haciendo uso de lipasas.

El proceso de transesterificación se da como un conjunto de reacciones consecutivas reversibles. Un triacilglicérol se convierte en diacilglicérol, luego en monoacilglicérol y finalmente en glicérol [Demirbas, 2005], como se observa en la figura 2 [Dossat y col., 2002].

Figura 2. Reacción general para la transesterificación de triglicéridos.



La reacción de alcoholólisis ha sido ampliamente usada para reducir la viscosidad de los aceites, reforzando las propiedades físicas de los combustibles para incrementar el desempeño del motor. De esta forma los alquil ésteres de ácidos grasos obtenidos por esta reacción se emplean como una alternativa de combustibles para los motores diesel.

Entre las características atractivas del combustible biodiesel obtenido por este método están: no es un derivado del petróleo, por tanto no hay un incremento en los niveles de CO₂; puede ser producido internamente ofreciendo la reducción de importaciones de petróleo; es biodegradable y en comparación con los

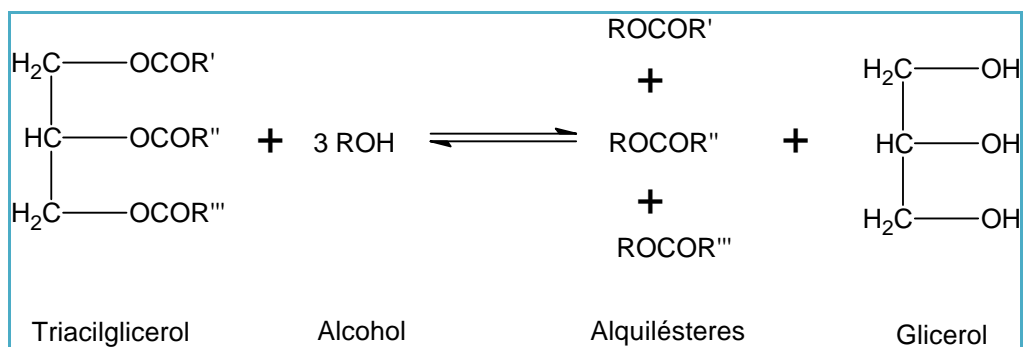
combustibles derivados del petróleo sus productos de combustión presentan niveles reducidos de partículas, monóxido de carbono y óxidos de nitrógeno [Fukuda y col., 2001].

1.3 REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS

La alcoholólisis implica tomar una molécula de triacilglicerol o un ácido graso complejo, la neutralización de los ácidos grasos libres, remoción de glicerina y la formación de un alquil éster. Es una reacción de equilibrio y la transformación ocurre esencialmente por la mezcla de los reactivos; generalmente se usa mayor cantidad de alcohol para que se favorezca la formación de alquil ésteres como producto [Demirbas, 2005].

La reacción general se muestra en la figura 3 y ocurre con o sin la presencia de un catalizador.

Figura 3. Reacción de alcoholólisis de un triacilglicerol genérico para la producción de alquil ésteres de ácidos grasos.



Como fuente de triacilgliceroles están los aceites y grasas de origen animal y vegetal y como alcoholes se usan los lineales de bajo peso molecular. El proceso de alcoholólisis es afectado por las condiciones de reacción, tipo de alcohol, relación

molar alcohol/aceite, tipo y cantidad de catalizador, tiempo de reacción, temperatura y pureza de los reactivos [Meher y col., 2004].

- **Relación molar alcohol/aceite.** Es una de las variables más importantes que afectan la producción de ésteres. La relación estequiométrica de la reacción requiere tres moles de alcohol y un mol de triacilglicerol para producir tres moles de alquil ésteres de ácidos grasos y un mol de glicerol. Sin embargo, la alcoholólisis es una reacción en equilibrio en la cual se requiere un exceso de alcohol para conducir la reacción hacia la derecha o la formación de producto. Para una mayor conversión del éster una relación 6:1 debe ser usada [Varma y Madras y col., 2007]. La relación molar no tiene efectos en la acidez, saponificación o valor de yodo de los alquil ésteres. A pesar de esto, una relación molar alta de alcohol respecto al aceite vegetal interfiere en la separación de la glicerina ya que hay un incremento de la solubilidad. Cuando queda glicerina en solución esta conduce el equilibrio hacia la izquierda reduciendo la producción de ésteres [Meher y col., 2004].
- **Tipo de alcohol.** Los alcoholes usados con mayor frecuencia son los de cadena corta como el metanol, etanol, propanol y butanol. El uso del etanol se favorece por el hecho de que éste es obtenido de la biomasa, así el proceso se independiza por completo del petróleo y el combustible finalmente obtenido proviene de la agricultura [Dantas y col., 2007].
- **Tipo de catalizador y la concentración.** En la alcoholólisis de triacilgliceroles los catalizadores usados pueden ser ácidos, básicos y enzimáticos o catalizadores heterogéneos. Dentro de los catalizadores básicos están el hidróxido y metóxido de sodio. Los ácidos pueden ser sulfúrico, fosfórico, hidrociorhídrico o el ácido orgánico sulfónico [Bournay y col., 2005].

La reacción es más rápida en presencia de un catalizador alcalino que en presencia de una cantidad igual de catalizador ácido. Éste último mostró también mayor selectividad, mayores rendimientos y menores problemas de corrosión [Dantas y col., 2007]. Sin embargo la catálisis química en general presenta desventajas porque el catalizador acidificado o alcalinizado debe ser removido del producto, las aguas de desecho alcalinas deben ser tratadas, la recolección del glicerol es difícil y se requiere gran cantidad de energía [Meher y col., 2004].

El proceso de transesterificación enzimática sobresale por las condiciones de trabajo suaves, efectividad, trabajo libre de solventes y biodegradabilidad. Actualmente la síntesis de biodiesel en alcoholes supercríticos sin catalizador es un método promisorio como reemplazo del proceso de transesterificación catalítica [Varma y Madras, 2007].

- **Efecto del tiempo de reacción y temperatura.** La conversión se incrementa con el tiempo de reacción. La temperatura afecta directamente la velocidad de la reacción y la actividad de las enzimas en los procesos biocatalizados.
- **Efecto de los ácidos grasos libres y la mezcla.** Como los ácidos grasos libres son ácidos no esterificados en el aceite, la presencia de estos es un parámetro que se emplea para evaluar el desarrollo de la reacción y en la caracterización de reactivos y productos. En el caso de la catálisis básica, altos niveles de acidez en el aceite conducen a valores bajos de conversión debido a procesos de neutralización, es decir, se favorece la formación de jabones [Demirbas, 2005].
- **Intensidad en el mezclado.** El mezclado o velocidad de agitación es muy importante debido a que los aceites y grasas son inmiscibles en las soluciones de metanol e hidróxido de sodio. Una vez las dos fases se mezclan y la reacción

comienza, la agitación se convierte en un factor insignificante. El efecto de la agitación en la cinética de la reacción es importante para un proceso a gran escala [Barnwal y Sharma, 2005].

- **Efecto del uso de co-solventes orgánicos.** Se han estudiado como co-solventes el THF, 1,4-hidrofurano y dietiléter. Los estudios reportan que el uso de co-solventes no influye en la velocidad de la reacción de alcoholisis pero si en la solubilidad de la grasa en el alcohol, aumentando el contacto entre los reactivos [Meher y col., 2004].

2. ANTECEDENTES

El uso de lipasas como catalizadores enzimáticos para la producción de biodiesel se ha afianzado debido a que éstas poseen especificidad de sustrato, de grupo funcional y estereo-especificidad en medio acuoso, ya sea en presencia o ausencia de solvente. Además, no requieren condiciones fuertes de reacción, las temperaturas reportadas varían de 40 a 70 °C y la reutilización del catalizador es posible si está inmovilizada.

La producción de biocombustibles usando lipasas fue descrita inicialmente por Mittlebach en 1990 quien mostró que la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* logró mayor producción que la *Candida* sp. y *Mucor miehei* para la alcoholólisis del aceite de girasol. La alcoholólisis se realizó en éter de petróleo como solvente y en condiciones libres de este, usando cinco alcoholes homólogos con o sin la adición de agua, desde entonces estudios subsecuentes se han centrado en las diferentes lipasas, así como en el uso de diversas fuentes de triacilglicérols, alcoholes y la variación de las condiciones experimentales (temperatura, cantidad de agua, relación estequiométrica entre los reactivos, concentración de enzima, uso de solvente, etc.).

Investigaciones realizadas por diferentes autores [Iso y col., 2001; Salis, 2003; Soumanou y col., 2003; Castellanos y González, 2004; Nouredini, 2005], han mostrado que las lipasas de *Chomobacterium viscosum* inmovilizada en Celite-545, *Pseudomona capacia*, *Pseudomona fluorencens*, *R. miehei* y *Thermomyces lanuginosus* son las que presentan mayor actividad en las reacciones de alcoholólisis. Haciendo uso de la TL, IM se han reportado los siguientes resultados: un rendimiento aproximado del 60% en la reacción de aceite de girasol con metanol [Soumanou y col., 2003. Wu y col., 2003] y rendimientos superiores al 90% usando aceite usado y aceite de soya respectivamente en presencia de

metanol [Du y col., 2003]. A nivel nacional Castellanos y González, 2004, reportaron rendimientos del 67% de la reacción de aceite de palmiste con etanol en presencia de lipozyme RM IM, mientras que Amado y Rodríguez, 2007, obtuvieron un rendimiento de 96,7% usando lipozyme TL, IM.

Xu y col., 2003, plantearon una nueva ruta de producción de biodiesel usando aceite de soya y metil acetato como aceptor acilo en proporción 12:1, en lugar de alcoholes de cadena corta como en el proceso de transesterificación tradicional. El rendimiento de producción de metil ésteres fue del 92% usando Novozym 435 como catalizador en una proporción del 30% respecto al peso del aceite. La temperatura con la cual se alcanzó el máximo rendimiento fue 40 °C. Debido a que el uso de metil acetato en el transcurso de la reacción no produce glicerol que generalmente inhibe la enzima, la lipasa se usó directamente en repetidas reacciones sin ningún tratamiento adicional. La actividad de la misma se mantuvo por más de 10 reusos.

2.1 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE HIGUERILLA

Los estudios de alcoholólisis del aceite de higuera usando lipasas como catalizadores son escasos. Mukesh y col., 1993, usaron aceite de higuera en presencia de n-butanol en relación molar 1:10 y Lipozyme IM-20 en un sistema con agitación magnética a temperatura ambiente. Encontraron que la reacción es inhibida por la cantidad de alcohol y que un incremento en la cantidad de enzima produce un aumento en la velocidad de la reacción.

De Oliveira y col., 2004 estudiaron la producción de etil ésteres a partir de aceite de higuera usando n-hexano como solvente y dos lipasas comerciales, Novozym 435 y Lipozyme IM como catalizadores, considerando como variables la temperatura, cantidad de agua suministrada, enzima y relación molar aceite/etanol, la máxima conversión obtenida de biodiesel fue para un sistema a

65 °C, con una concentración del 20% p/p de la enzima y en ausencia de agua. El sistema que contenía Novozym 435 como catalizador alcanzó una conversión del 81.4%, con una relación molar aceite/ alcohol de 1:10; mientras que con el uso de Lipozyme IM, la conversión fue del 98% obtenida con una relación molar 1:3 de los sustratos.

Meneghetti y col., 2006, realizaron un estudio comparativo para la transesterificación del aceite de higuera usando metanol y etanol con una relación molar alcohol/aceite/catalizador de 60:10:2. Observaron que la reacción empleando metanol fue más rápida. Los rendimientos reportados fueron del 80% para la etanolisis a 80 °C y del 90% para la metanolisis a 60 °C. El rendimiento máximo se obtuvo con el uso de metóxido de sodio como catalizador. En el mismo año, Meneghetti y col., realizaron una etanolisis para transesterificar aceite de higuera con diferentes catalizadores. La relación alcohol/aceite/catalizador fue: 60:10:2; la influencia del catalizador se evaluó usando HCl y NaOH. Encontraron que la concentración del mismo no afectó la producción de etil ésteres. El efecto de la temperatura usando HCl como catalizador influyó en el porcentaje de conversión en la cual a una temperatura de 100 °C, se obtuvo un 80% de etil éster y 54% con una temperatura de 80 °C. También reportaron obtención del 80% de etil éster utilizando NaOH como catalizador en 1 hora de reacción mientras que con HCl sólo se obtuvo un 10%. Bajo las mismas condiciones se obtuvo en una hora mayor rendimiento de la transformación de aceite de higuera que de aceite de semilla de algodón.

Conceição y col., 2007, como parte de un estudio de las propiedades reológicas del biodiesel a partir de aceite de higuera, realizaron una alcoholisis alcalina usando metanol e hidróxido de potasio. La relación alcohol/aceite fue 4:1 y el porcentaje de catalizador fue de 1% respecto a la masa de aceite usada. Por cromatografía de gases se encontró que el contenido de metil ésteres fue de 97.7%.

Varma y Madras, 2007, obtuvieron rendimientos de conversión del 50% y 37% usando metanol y etanol supercríticos respectivamente. Las condiciones óptimas fueron: relación molar alcohol/aceite 5:1, 20% de enzima (Novozym 435) respecto al peso del aceite usado y un rango de temperatura entre 45-50 °C.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Para la reacción de alcoholisis se emplearon como sustratos aceite de higuera comercial y el etanol anhidro grado analítico. La reacción se catalizó con la enzima 1,3-estereoespecífica *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada, conocida comercialmente como Lipozyme TL, IM, suministrada por la empresa Saceites S.A. Las características de la enzima se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. 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 húmeda	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 triestearina en condiciones analíticas estándar.	

3.2 MÉTODO DE ANÁLISIS

- **Índice de acidez.** Se define como los miligramos de KOH necesarios para neutralizar 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.

$$Ia = \frac{V * N * 56.1}{PM} \quad (1)$$

Donde: V: volumen de la solución valorante.
N: normalidad de la solución valorante.

PM: peso de la muestra de aceite en gramos.

56.1: peso molecular del KOH.

- **Análisis de etil ésteres y acilglicerolés en productos por cromatografía de gases.** Las determinaciones se establecieron de acuerdo con la norma ISO 5508 para ésteres metílicos y el método AOAC 986.19/1990 para triacilglicerolés. Se usaron como patrón de referencia aceite de higuera para triacilglicerolés, y una mezcla de ésteres etílicos preparados y purificados a partir del mismo, transesterificado por catálisis química como patrón de alquil ésteres.

Las cantidades relativas de ésteres grasos, así como acilglicerolés parciales y triacilglicerolés que no reaccionaron que se encuentran presentes en el producto de reacción, se determinaron simultáneamente por el método de normalización de áreas de los cromatogramas obtenidos por análisis de cromatografía de gases de alta temperatura. Para la identificación de la zona de etil ésteres se empleó un patrón de ésteres etílicos preparados a partir del aceite de higuera y para la de los triacilglicerolés aceite de higuera.

Los productos de reacción muestran un perfil cromatográfico similar con tres regiones definidas: ésteres etílicos, mono y diacilglicerolés identificados como acilglicerolés parciales, y triacilglicerolés. En el anexo A, se muestra el perfil cromatográfico de uno de los productos obtenidos con la diferenciación de las zonas de los grupos identificados.

Todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890N. Se usó una columna capilar metálica con las siguientes especificaciones: Restek MXT-65TG, 65% difenil-35% dimetil polisiloxano; temperatura máxima 370° C, polaridad intermedia, diseñada para análisis de ésteres grasos, ácidos grasos libres y triacilglicerolés. Todos los análisis se realizaron usando la siguiente secuencia: temperatura inicial 80 °C, a razón de 80 °C/min se alcanzó una

temperatura de 220 °C, luego de un minuto a razón de 0.5 °C/min se llegó a 222°C, dos minutos después a una razón de 1 °C/min se alcanzó una temperatura de 225 °C, después de un minuto a 100 °C/min se alcanzó una temperatura de 320 °C. Finalmente, transcurrido un minuto a una razón de 40 °C/min, se alcanzó una temperatura final de 365 °C. El gas de arrastre usado fue helio, puerto de inyección en modo split a 250 °C y detector FID a 360 °C.

3.2.1 Evaluación de las restricciones de difusión. Para evaluar las restricciones de difusión externa, se realizaron experimentos variando la velocidad de agitación en un rango de 100 a 200 rpm, a las condiciones operacionales seleccionadas en el diseño experimental.

Las restricciones de difusión interna fueron evaluadas previamente por Amado y Rodríguez, 2007; quienes encontraron que ésta no afecta la producción de alquil ésteres y por lo tanto la enzima puede ser utilizada tal como la provee el fabricante.

3.3 REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS

La reacción de alcoholísis se llevó a cabo en un reactor batch con capacidad de 100 mL como el mostrado en la figura 4. Usando como sustratos aceite de higuera, etanol y el catalizador enzimático Lipozyme TL, IM, se fijaron dos factores para llevar a cabo la reacción de alcoholísis. La cantidad de enzima se fijó en un 9% respecto al peso del aceite según lo reportado en el trabajo de Amado y Rodríguez, 2007. De los factores que afectan la reacción se estableció también la velocidad de agitación a la cual se sometió el sistema. Por la información obtenida de la evaluación de restricciones difusionales se estableció una velocidad de agitación de 150 rpm para todos los experimentos.

Figura 4. Montaje utilizado para llevar a cabo la reacción de alcoholísis.



En todas las reacciones se emplearon relaciones molares de aceite de higuera/etanol comprendidas entre el rango de 1:4 a 1:6 respectivamente. Esta relación se escogió teniendo en cuenta los estudios realizados por Abigor y col., 2000; Oliveira y Oliveira., 2001; Du y col., 2003; Wu y col., 2003; Castellanos y Gonzáles., 2004; Amado y Rodríguez, 2007.

La enzima se sometió 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.

Una vez culminado el pretratamiento, la enzima se mezcló con la cantidad de aceite requerida para la reacción de alcoholísis y se incubó el sistema en el baño termostático a la temperatura establecida dentro de un rango de 40 a 50 °C.

Posteriormente se adicionó el alcohol, iniciándose en éste punto el conteo de tiempo de reacción dado para cada experimento (entre 60 a 180 minutos). Una vez finalizada la reacción, se inactivó la enzima sumergiendo el reactor en un baño de hielo. Seguidamente se filtró la mezcla de reacción y el producto se almacenó en atmósfera de nitrógeno y baja temperatura para su posterior análisis.

Todas las reacciones se llevaron a cabo sin adición de agua al sistema teniendo en cuenta que las condiciones anhidras son las más favorables para la producción de los ésteres alquílicos, como ha sido reportado por Iso y col., 2001; Castellanos y González, 2004; Nouredini y col., 2005; Amado y Rodríguez, 2007.

3.3.1 Evaluación de las variables de estudio. En el proyecto de investigación se definieron los rangos de las siguientes variables de estudio: temperatura, relación de sustratos y tiempo de reacción, las cuales influyen en el proceso de transesterificación (ver tabla 6). Dichas condiciones se establecieron con base en los resultados obtenidos por Soumanou y Bornscheuer, 2003; Du y col., 2003; Wu y col., 2003; Castellanos y González., 2004; Amado y Rodríguez, 2007. La variable de respuesta es el rendimiento de la reacción que se expresa en éste trabajo como porcentaje de etil ésteres.

Tabla 6. Código de los niveles del diseño experimental

VARIABLE INDEPENDIENTE	SÍMBOLO	CÓDIGO DE LOS NIVELES		
		-1	0	1
Temperatura [°C]	X ₁	40	45	50
Relación de sustratos [Aceite/ Etanol]*	X ₂	1:4	1:5	1:6
Tiempo de la reacción [min]	X ₂	60	120	180

*Relación de sustrato correspondiente a Volumen de etanol adicionado 5.02, 6.27 y 7.52mL por 20g de aceite de higuera.

3.3.2 Evaluación de las condiciones óptimas de reacción. Una vez establecidos los intervalos de las variables de estudio, se evaluaron las condiciones de reacción en un sistema en discontinuo a escala de laboratorio (con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS) aplicando un diseño experimental que permitió evaluar los efectos de las variables de forma individual, así como las interacciones entre las mismas, para alcanzar altos niveles de producción de etil ésteres usando la metodología de análisis de superficie de respuesta y otras herramientas de análisis que brinda el software estadístico STATGRAPHICS. De esta forma se realizó un modelo experimental de las condiciones bajo las cuales se obtuvo el máximo rendimiento de la reacción.

Cada experimento se realizó por duplicado en todos los puntos obteniendo un total de 46 experimentos. (Ver tabla 7).

Tabla 7. Puntos del diseño experimental

EXPERIMENTO	Nivel de las variables codificado		
	TEMPERATURA	RELACIÓN DE SUSTRATOS	TIEMPOS DE REACCIÓN
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	-1	-1	1
5	1	-1	-1
6	0	0	0
7	0	0	0
8	-1	1	-1
9	-1	-1	-1
10	-1,68179*	0	0
11	0	-1,68179*	0
12	-1	1	1
13	0	0	0
14	0	0	1,68179*
15	0	0	0
16	0	1,68179*	0
17	1,68179*	0	0
18	1	1	-1
19	1	1	1
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.

La variable de respuesta escogida, se definió como el porcentaje de etil ésteres (Y_1).

3.4 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA.

Una vez halladas las condiciones óptimas para la producción de etil ésteres, se evaluó la estabilidad operativa de la enzima y su respuesta al reuso. La enzima se empleó sucesivamente en varias reacciones de alcoholisis realizadas bajo los mismos parámetros operacionales, empleando las condiciones de temperatura, relación de sustratos y tiempo de reacción de las condiciones óptimas de reacción. Una vez recogido el producto, la enzima se filtró y se usó nuevamente en otro sistema idéntico. Para cada lote se determinó el porcentaje de conversión y el índice de acidez. El proceso se llevó a cabo las veces necesarias hasta que se obtuvo un cambio significativo en la actividad enzimática, lo cual determinó la variación del rendimiento de la reacción.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El índice de acidez es una herramienta versátil en el momento de caracterizar el aceite y el producto de la reacción de alcoholisis debido a la facilidad en cuanto a su determinación y los cambios notorios que se dan en cada una de las etapas del pretratamiento y de la reacción. Simultáneamente al conocer la acidez del medio en el cual se usa la enzima, se prevén inconvenientes relacionados con la inactivación de ésta por un pH poco favorecedor.

A continuación en las tablas 8 y 9 se relacionan cada una de las determinaciones realizadas para el sustrato graso, las porciones de aceite usadas en el pretratamiento del catalizador y el producto de reacción. Las determinaciones como se indican en el numeral 3.2 se reportan como índice de acidez.

Tabla 8. Índice de acidez del sustrato usado en reacción y pretratamiento

PRETRATAMIENTO	ÍNDICE DE ACIDEZ
Aceite Reacción	0.27
1. Vacío	1.24
2	1.12
3	1.00
4	0.98

Tabla 9. Índice de acidez del biodiesel de la reacción modelo de máxima producción de etil ésteres.

BIODIESEL	ÍNDICE DE ACIDEZ
A	0.55
B	0.47
C	0.45
Promedio=	0.49

Se observa en la primera etapa del pretratamiento una elevación del índice de acidez en el aceite usado respecto al índice de acidez del aceite puro. Este incremento en el índice de acidez es originado por la humedad presente en la enzima, la cual lleva a cabo una reacción de hidrólisis en el aceite, aumentando así en número los ácidos grasos libres. A medida que el aceite se fue cambiando en el transcurso del pretratamiento, la acidez del mismo disminuyó porque la humedad fue eliminada gradualmente de la enzima, lo que aseguró la mínima generación de ácidos grasos en el sistema de reacción de la alcoholólisis.

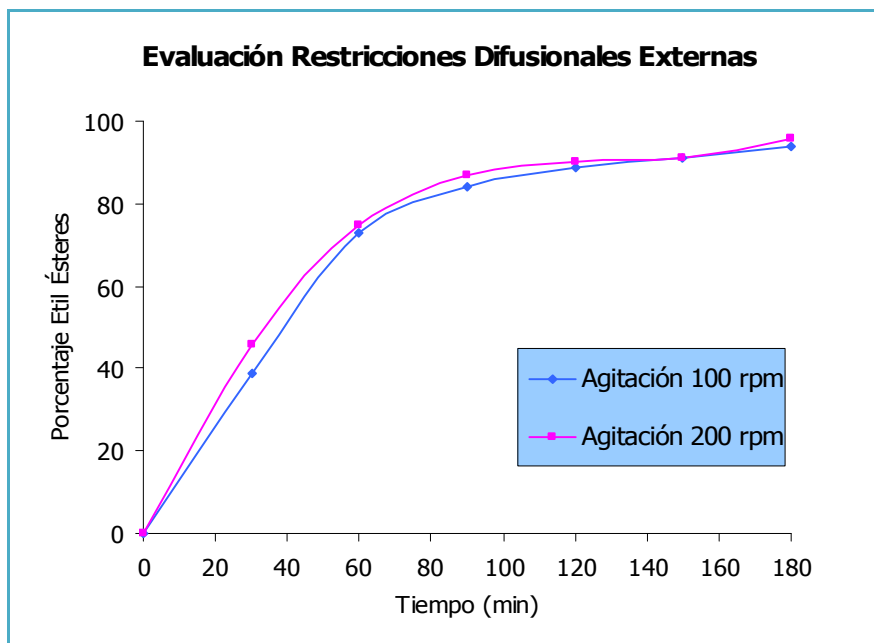
4.2 EVALUACIÓN DE LAS RESTRICCIONES DIFUSIONALES

Contemplando la posibilidad de existencia de restricciones difusionales en el sistema de reacción y con la finalidad de establecer la velocidad de agitación adecuada para llevar a cabo las reacciones de alcoholólisis, se evaluó la influencia de éste tipo de restricciones haciendo seguimiento de la reacción en el tiempo (tabla 10). En un reactor batch y a una temperatura de 45 °C, se llevó a cabo la reacción de alcoholólisis con una cantidad de enzima constante del 9% y una relación molar aceite/etanol 1:4. La figura 5 muestra que no existen diferencias significativas en la producción de etil ésteres con respecto a las velocidades de agitación estudiadas (100 y 200 rpm). Por tanto se estableció una velocidad de agitación de 150 rpm para todos los experimentos.

Tabla 10. Porcentaje de etil ésteres según la velocidad de agitación en el transcurso del tiempo de la reacción

TIEMPO DE REACCIÓN (MIN)	PORCENTAJE ETIL ÉSTERES	
	100 RPM	200 RPM
0	0	0
30	39	46
60	73	75
90	84	87
120	89	90
150	91	91
180	94	96

Figura 5. Porcentaje etil ésteres versus tiempo para dos velocidades de agitación



4.3 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN

Los porcentajes de producción de ésteres alquílicos obtenidos por medio de cromatografía de gases en los experimentos del diseño central compuesto rotatorio y ortogonal de $2^3 +$ estrella (CCRD) se presentan a continuación en la tabla 11.

Para cada caso de estudio, se realizó un análisis estadístico empleando el software STATGRAPHICS donde se incluye: tabla ANOVA, diagrama de Pareto, el valor óptimo de las variables que maximizan el porcentaje de etil ésteres producidos en la reacción.

Tabla 11. Rendimiento de la reacción según el resultado del diseño experimental.

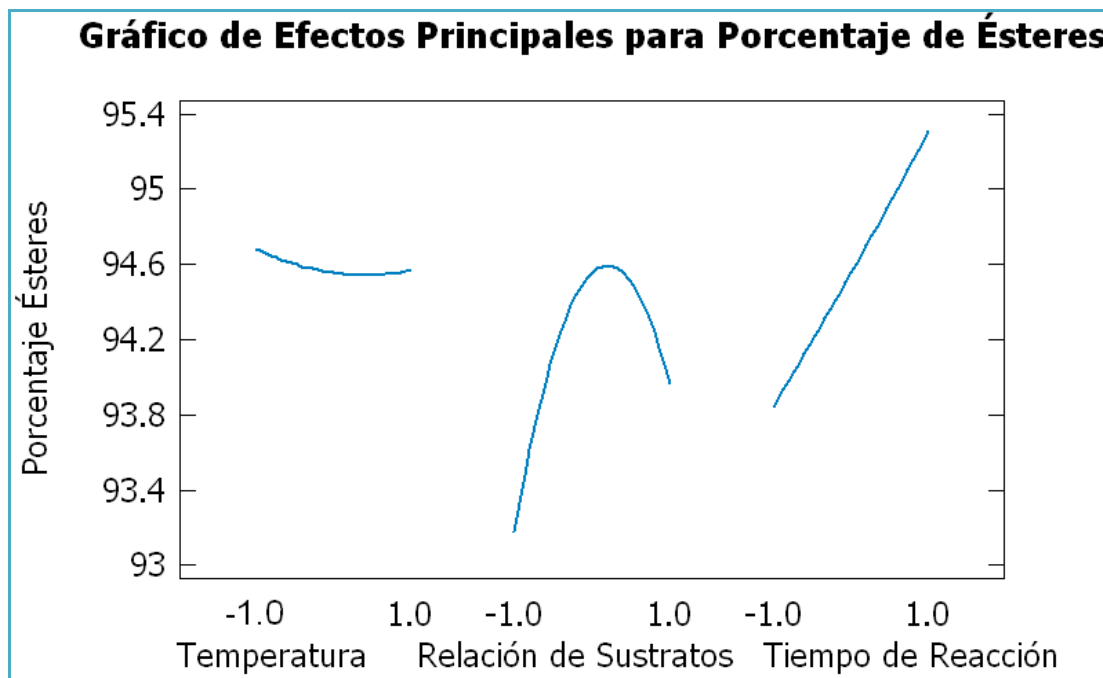
EXPERIMENTO	TEMPERATURA [°C]	RELACIÓN MOLAR DE SUSTRATOS [ETANOL/ACEITE]	TIEMPOS DE REACCIÓN [min]	RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN*[%]
1	45	5	120	94.71
2	45	5	120	96.79
3	45	5	120	93.69
4	40	4	180	94.43
5	50	4	60	93.04
6	45	5	120	93.15
7	45	5	120	93.53
8	40	6	60	95.07
9	40	4	60	93.82
10	36.6**	5	120	93.82
11	45	3.32**	120	90.02
12	40	6	180	94.54
13	45	5	120	94.22
14	45	5	221**	96.18
15	45	5	120	95.00
16	45	6.68**	120	91.40
17	53.4**	5	120	93.56
18	50	6	60	95.18
19	50	6	180	94.39
20	45	5	120	94.55
21	50	4	180	94.88
22	45	5	19**	90.92
23	45	5	120	95.73

*Expresado como porcentaje de etil ésteres

**Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad.

En la figura 6 se muestra el diagrama de efectos principales para el porcentaje de etil ésteres. Se presenta la variable de respuesta, es decir, el rendimiento de la reacción como función de cada una de las variables de forma independiente. La tendencia de cada línea refleja la influencia positiva o negativa de cada variable y la pendiente permite establecer la evolución de la forma en la que cambia el rendimiento de la reacción en el rango de los niveles evaluados.

Figura 6. Rendimiento de la reacción como función de las variables independientes.



Se observa cómo la temperatura en el rango en el cuál se evaluó no afecta el rendimiento, se mantiene casi constante mostrando una ligera disminución con el incremento de la temperatura. Ésta tendencia coincide con la información reportada por Du y col., 2003 sobre la relación de la actividad enzimática en la temperatura, autores que reportaron pérdidas de la actividad enzimática para valores superiores a 50 °C.

La relación de sustratos muestra una fuerte tendencia al aumento en el rendimiento conforme aumenta la cantidad de alcohol adicionado. Una vez esta relación alcanza el punto máximo que corresponde a una relación de sustratos aceite/etanol 1:-0,42, la caída en el rendimiento es evidente. El marcado cambio de pendiente indica una fuerte dependencia del porcentaje de ésteres con la relación de sustratos. El tiempo de reacción por su parte, muestra una relación directa con la variable de respuesta, la cual alcanza su valor máximo en valores

cercanos al límite superior del rango, es decir para un tiempo de reacción mayor o igual a 180 minutos.

- **Análisis de varianza ANOVA.** El análisis de varianza (ANOVA) muestra los efectos que tienen significancia estadística (tabla 12) y permite averiguar cuál de las variables evaluadas está relacionada con el aumento o disminución en el rendimiento de la reacción. El diagrama de Pareto (figura 7), muestra todos los efectos de las mismas variables y las combinaciones entre ellas en orden decreciente de afectación al porcentaje de etil ésteres.

Tabla 12. Análisis de varianza para el porcentaje de etil ésteres

FACTOR	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO PROMEDIO	VALOR F	VALOR P
A: TEMPERATURA	0.05	1	1	0.02	0.88
B: RELACIÓN DE SUSTRATOS.	2.06	1	1	0.93	0.35
C: TIEMPO DE REACCIÓN.	7.24	1	1	3.26	0.09
AA	0.08	1	1	0.03	0.86
AB	0.01	1	1	0.00	0.96
AC	0.11	1	1	0.05	0.83
BB	15.35	1	1	6.91	0.02
BC	1.84	1	1	0.83	0.38
CC	0.01	1	1	0.00	0.96
ERROR TOTAL	28.89	13	2.22		
ERROR CORREGIDO	55.65	22			

$R^2 = 48.08\%$

R^2 ajustado para los grados de libertad= 12.14%

Error estándar EST.= 1.49

Error absoluto promedio= 0.91

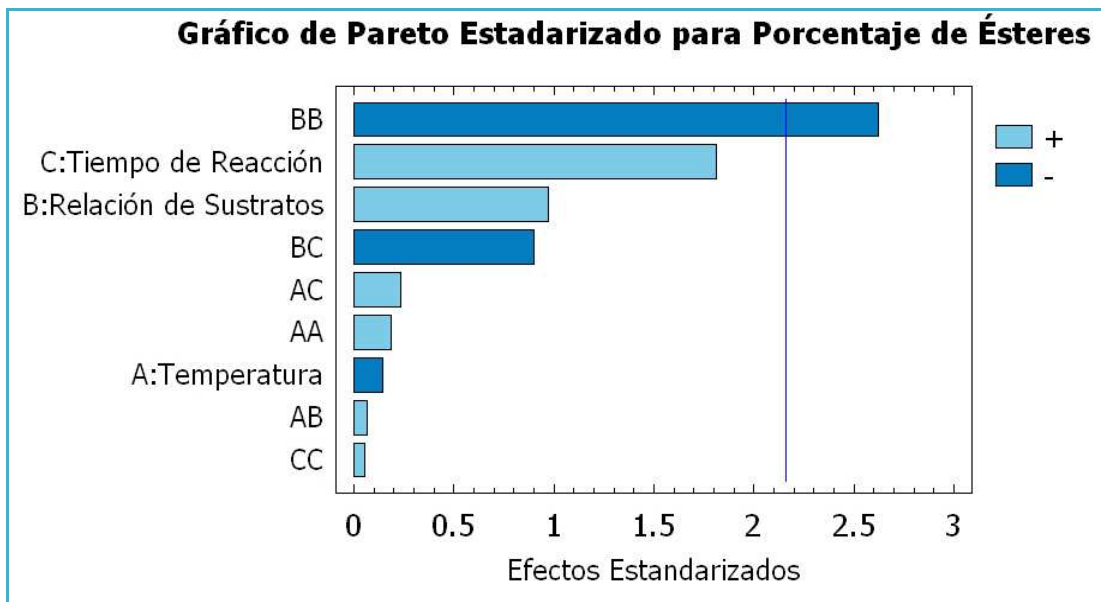
El análisis de la varianza (ANOVA) además permite establecer la variación debida a los diferentes factores, a la interacción entre ellos, al efecto de cada factor al cuadrado y a la variación aleatoria debida a errores experimentales (error total). En este caso, solo un efecto, el cuadrático BB de Relación de sustratos, posee un valor de P menor de 0,05, mostrando con ello que es significativamente diferente de cero en un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 13. Efectos estimados para el porcentaje de etil ésteres.

TÉRMINOS		EFECTO ESTIMADO	ERROR ESTANDAR
Lineal	Promedio	94.5	0.50
	A: Temperatura	-0.12	0.81
	B: Relación de sustratos	0.78	0.81
	C: Tiempo de reacción	1.45	0.81
Cuadrático	A*A	0.14	0.75
	B*B	-1.97	0.75
	C*C	0.04	0.75
Interacciones	A*B	0.06	1.05
	A*C	0.23	1.05
	B*C	-0.97	1.05

Los resultados obtenidos se corroboran con el diagrama de Pareto (figura 7). La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar, tabla 13). La barra que se extiende más allá de la línea azul corresponde al efecto significativo en un nivel de confianza del 95 %. Los efectos señalados con azul claro inciden de forma favorable sobre el porcentaje de ésteres y los que aparecen en azul oscuro poseen una incidencia desfavorable sobre el mismo. En este estudio el factor cuadrático BB incide en forma significativa sobre el porcentaje de etil ésteres en el producto.

Figura 7. Diagrama de Pareto para el porcentaje de etil ésteres.



A continuación se muestra la ecuación que representa el modelo predicho para la reacción de alcoholólisis:

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje de etil ésteres} &= 94.56 - (0.06)A + (0.39)B + (0.73)C + (0.07)A^2 + (0.04)AB \\ &+ (0.12)AC - (0.98)B^2 - (0.47)BC + (0.02)C^2 \end{aligned} \quad (2)$$

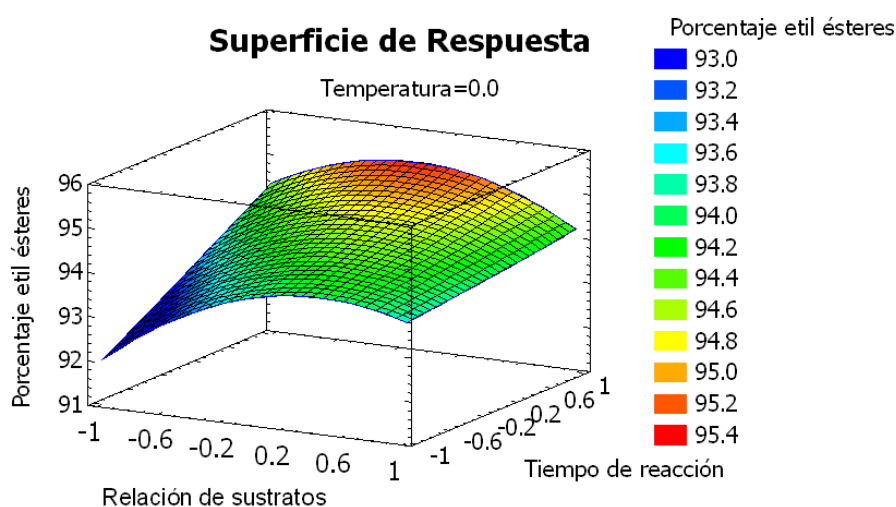
Dónde A corresponde a la temperatura, B a la relación de sustratos y C al tiempo de reacción. Puede observarse que ésta ecuación tiene términos tanto lineales como cuadráticos y es, según los resultados del diseño experimental analizados hasta el momento, el término cuadrático BB el único factor que afecta de forma significativa la ecuación que describe la máxima producción de etil ésteres bajo las condiciones indicadas.

- **Selección de las condiciones óptimas de la reacción.** Con base en el modelo anterior (ecuación 2), se construyeron gráficas de superficie de respuesta con el fin de seleccionar las condiciones óptimas de reacción para llegar a

alcanzar el máximo rendimiento de la reacción. Estas gráficas permiten evaluar la interacción entre dos variables manteniendo la tercera constante y su efecto sobre la producción de etil ésteres. Todas las gráficas de superficies de respuesta muestran las diferentes regiones de producción incluyendo la de mayor porcentaje. Las superficies y su respectiva división por regiones fueron elaboradas con la ayuda del software Statgraphics Centurión XV.

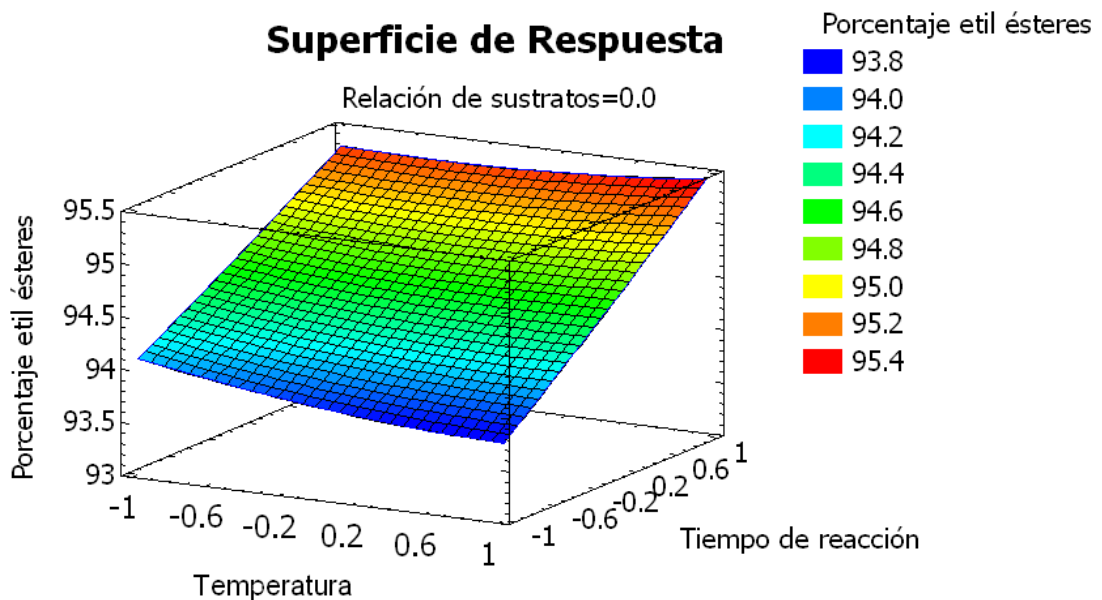
En la figura 8, se presenta la superficie de respuesta obtenida al comparar la relación de sustratos y el tiempo de reacción manteniendo la temperatura constante en su valor central. Los valores más altos de porcentaje de etil ésteres se alcanzan cuando en la reacción se emplea una relación de sustratos de 1:5 y un tiempo de reacción de 180 minutos respectivamente. La curva que hace referencia a la relación de sustratos muestra inicialmente una pendiente positiva, teniendo un punto de inflexión en el nivel central, la pendiente se hace negativa para valores mayores de relación de sustratos. La tendencia del tiempo de reacción es positiva para la conversión a medida que aumenta del nivel negativo al positivo.

Figura 8. Superficie de respuesta para el porcentaje de etil ésteres con la temperatura constante en su valor central.



En la figura 9, se muestran los efectos combinados de temperatura y tiempo de reacción con respecto a la relación de sustratos en el valor central dan un máximo del 95.4% de producción de etil ésteres. Esta conversión corresponde a un tiempo de reacción de 180 minutos y una temperatura de 50 °C, de los niveles más altos evaluados. Lo anterior se evidencia primero con la pronunciada pendiente de la superficie con respecto a la variable tiempo de reacción, y con la pendiente de la temperatura.

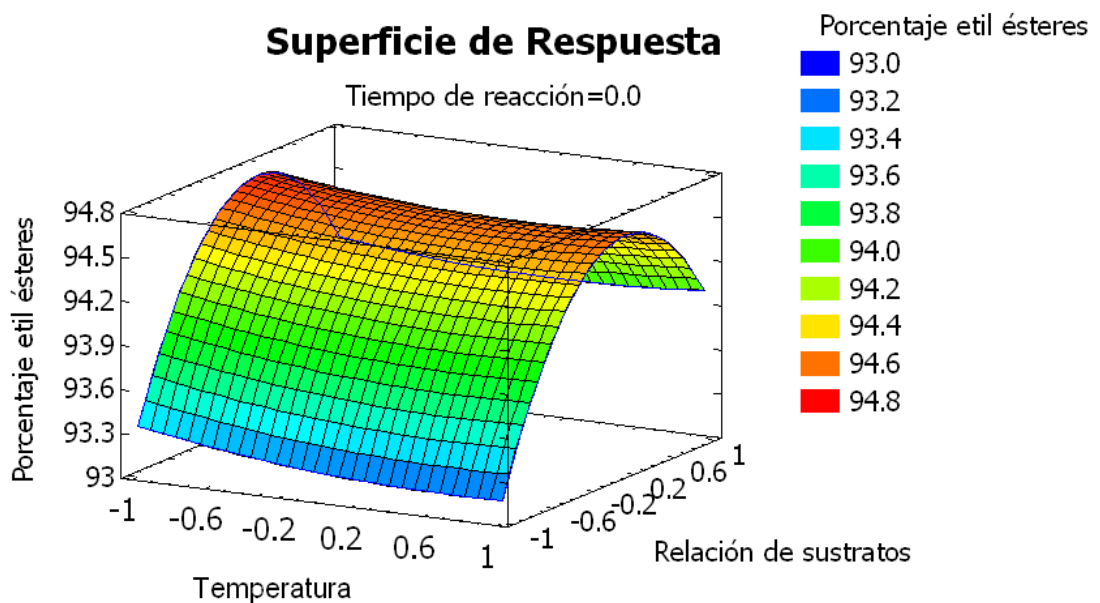
Figura 9. Superficie de respuesta para el porcentaje de etil ésteres con la relación de sustratos constante en su valor central.



Si se considera la influencia de la temperatura y la relación de sustratos manteniendo el tiempo de reacción constante en su valor central, se determina que para alcanzar valores altos de rendimiento es necesario utilizar una temperatura baja de 40 °C y una relación de aceite/etanol de 1:5 (figura 10). La superficie muestra que la relación de sustratos tiene un efecto positivo en el porcentaje de etil ésteres a medida que va del valor mínimo al central según el

código de niveles. Sin embargo, este máximo decae en tanto aumenta la relación aceite/etanol hacia valores por encima del valor central. La curva de la temperatura muestra cambios leves en su pendiente al desplazarse del nivel negativo al positivo.

Figura 10. Superficie de respuesta para el porcentaje de etil ésteres con tiempo de reacción constante en su valor central.



De acuerdo con los resultados anteriores, se aplicó la metodología de optimización multivariable, con la cual se analizó de forma paralela el efecto de la temperatura, la relación de sustratos y el tiempo de reacción sobre la variable en porcentaje de etil ésteres, estableciendo así las condiciones de reacción en las cuales se maximiza la conversión. Los valores de las condiciones óptimas de reacción se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores de las condiciones óptimas de reacción

FACTOR	CÓDIGO DE NIVEL ÓPTIMO		PORCENTAJE ÓPTIMO
Temperatura	1.68179	53.4°C	
Relación molar de Sustratos Aceite/Etanol	-0.177904	1:4,8	96.32%
Tiempo de Reacción	1.68156	221min	

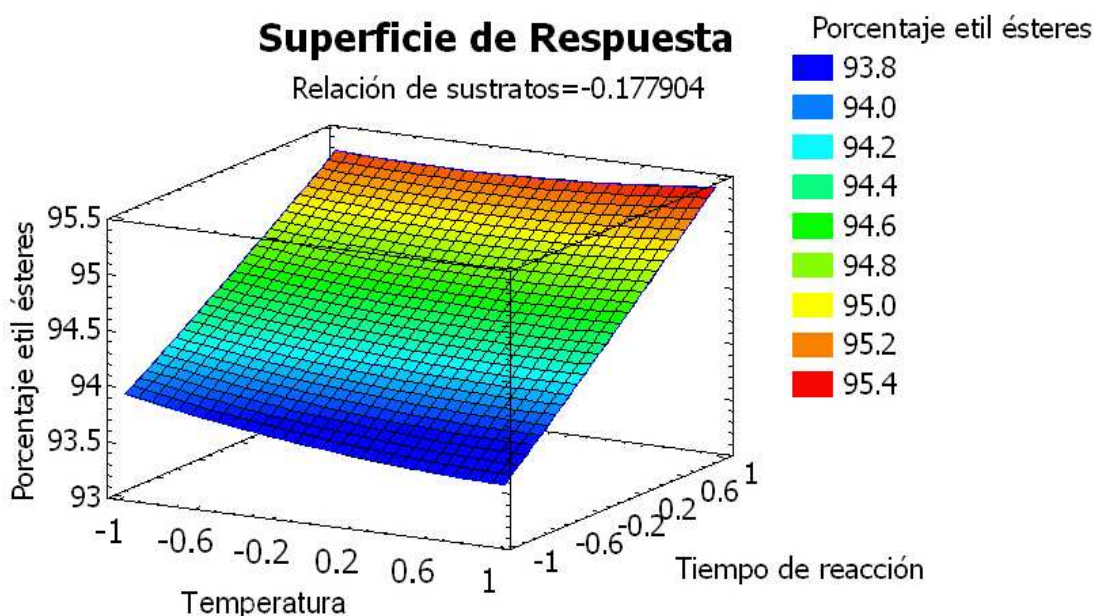
Una vez los valores óptimos para las variables fueron establecidos, se procedió a evaluar la superficie de repuesta dejando fijo el factor relación de sustratos con el nivel óptimo generado por el modelo (figura 11). La gráfica muestra que para una relación de aceite/etanol 1:4,8, tanto el tiempo de reacción como la temperatura deben ajustarse a los niveles óptimos dados en el estudio, es decir 3.7 horas y 53.4 °C respectivamente. Es notable el crecimiento pronunciado en la pendiente del tiempo de reacción, en comparación al de la temperatura, tal como se observó en la superficie analizada para el mismo factor pero con un nivel central (figura 9).

Para confirmar las condiciones óptimas predichas por el método de optimización multivariable, el sistema de reacción se realizó por triplicado, promediando así el porcentaje de producción de etil ésteres como es mostrado en la tabla 15. La diferencia entre los valores óptimos, predicho y obtenido es del 1.20%, valor que confirma una satisfactoria aproximación del modelo en cuanto a la maximización en el porcentaje de la producción de etil ésteres.

Tabla 15. Validación del modelo ajustado

Porcentaje de etil ésteres	
Valor Obtenido	Valor Predicho
97.48%	96.32%
Diferencia porcentual: 1.2%	

Figura 11. Superficie de respuesta para el grado de optimización con la relación de sustratos óptima.



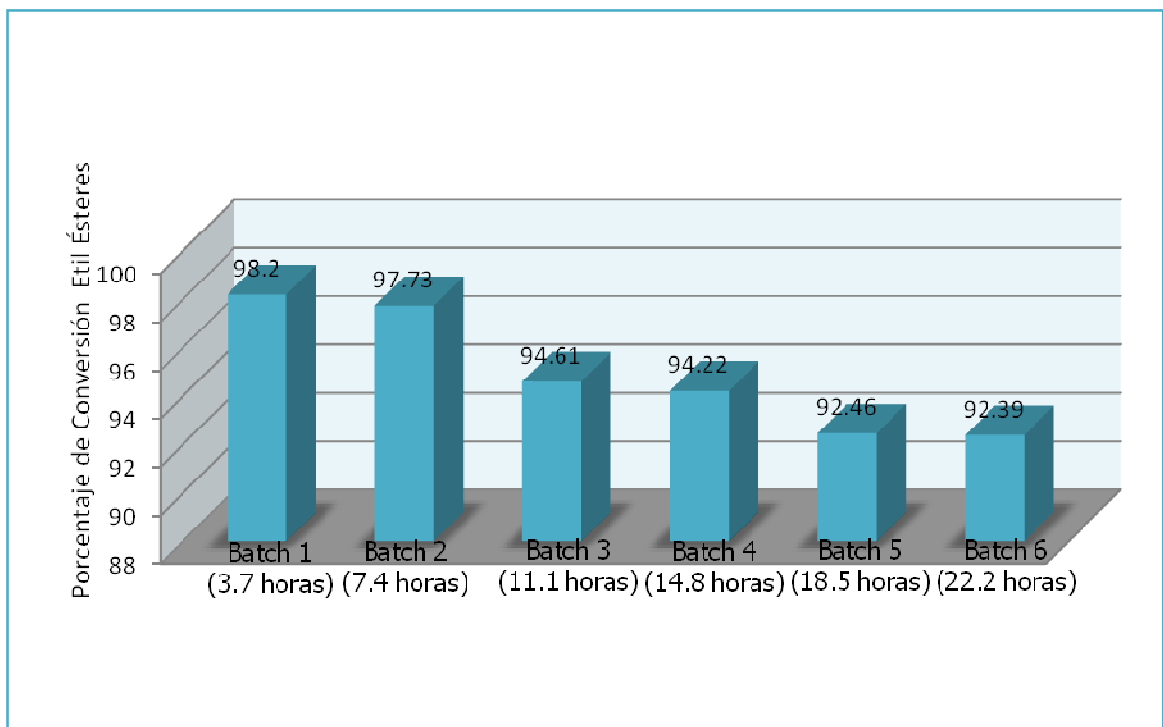
4.4 ESTABILIDAD OPERATIVA DE LA ENZIMA Y REUSO

Durante las primeras 7 horas de evaluación del reuso de la enzima (figura 12), el rendimiento en la producción de etil ésteres se mantuvo prácticamente constante en valores cercanos a los óptimos según lo obtenido anteriormente con la reacción modelo. A pesar de que la disminución en el rendimiento de la reacción es notoria a partir del tercer batch, los porcentajes de etil ésteres permanecen altos, por encima del 90% en las 22.2 horas de reacción en las que fue evaluada la enzima.

La disminución en el rendimiento de la reacción se da como consecuencia de la inactivación térmica de la enzima, de su desorción del soporte y de la pérdida durante el proceso de filtración del producto para el reuso sucesivo de la misma porción de enzima.

Otras referencias a la estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM se encuentran en la literatura. Amado y Rodríguez, 2007, reportan rendimientos que superan el 90% en las primeras 12 horas de reacción y 69,9% de conversión luego de 18 horas. En el trabajo realizado por Soumanou y col., 2003, se muestra que la enzima pierde cerca del 50% de su actividad inicial a las 48 horas. En el estudio llevado a cabo por Castellanos y col., 2004, se reportó que la enzima pierde cerca del 60% de actividad después de 6 horas de reacción (segundo batch).

Figura 12. Estabilidad operacional de la Lipozyme TL, IM en las condiciones óptimas de producción.



4.5 PRODUCTIVIDAD DE LA ALCOHÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE HIGUERILLA

En la tabla 16 se presentan los resultados obtenidos en trabajos donde fue usada Lipozyme TL, IM como catalizador en la transesterificación de aceites vegetales y en la tabla 17 se comparan investigaciones en las que la fuente de triacilgliceroles fue el aceite de higuera en presencia de diferentes catalizadores.

La gran variedad de condiciones bajo las cuales se desarrollaron los diferentes estudios impide hacer comparaciones directas de los rendimientos de la reacción de alcoholisis. Por esto se calculó para cada resultado reportado, 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 [Illanes, 1994].

El mayor rendimiento (98%) se observa en los resultados reportados por De Oliveira y col., 2004. Este rendimiento se alcanzó usando un porcentaje de enzima superior al empleado en éste trabajo (9%), al igual que la temperatura (53.4 °C) y el tiempo de reacción (3.7h). Además estos autores usan solvente, factor que incrementa costos y generan problemas de extracción, purificación del producto y manejo de desechos.

Los trabajos de Du (2003, 2005) y Wu (2003) a pesar de presentar buenos rendimientos, muestran tiempos de reacción extensos que disminuyen la productividad del trabajo. La cercanía entre los resultados de Castellanos (2004), Amado (2007) y los reportados en éste trabajo, que son a su vez los de mayor productividad, radica en la cercanía entre las condiciones de trabajo, condiciones que como ya se mencionaba anteriormente afectan directamente el desempeño de la reacción y la productividad del proceso.

También debe tenerse en cuenta que el uso de diferentes sustratos puede dar lugar a interacciones diferentes entre la enzima y los triacilglicerolos. En el caso de la Lipozyme TL, IM, a nivel internacional se reportan diversos aceites para el desarrollo de investigaciones que implican reacciones de alcoholisis, sin embargo, sólo esta investigación aborda el uso de aceite de higuera.

Para ampliar las posibilidades de comparación en la tabla 17 se comparan los resultados de estudios de la transesterificación enzimática y química de aceite de higuera. Puede observarse que los valores de productividad y productividad específica de éste trabajo solo son superados por los trabajos desarrollados con el uso de catalizadores químicos, trabajos que además incluyen valores elevados de temperatura. El trabajo de De Oliveira (2004) es quizás el de condiciones más cercanas a las aquí utilizadas, y si bien, con el uso de lipasas de *Mucor Miehei* alcanzó altos valores de producción de alquil ésteres, la cantidad de enzima usada es más del doble de la cantidad de enzima usada en éste trabajo para las condiciones de máxima producción.

Con respecto a las propiedades de los ésteres alquílicos obtenidos a partir de aceite de higuera y etanol, Cvengros (2006), los encuentra dentro de los rangos establecidos para el uso como biodiesel, con algunos inconvenientes en los valores de viscosidad, densidad y número de cetano, inconvenientes que pueden superarse fácilmente realizando mezclas; la presencia del grupo hidroxilo no tiene influencia en los parámetros mencionados y no limita el uso de estos ésteres como combustible. Benavides (2007), los encuentra dentro de los rangos establecidos para el uso como biodiesel en mezclas hasta del 15%.

Finalmente se puede establecer que la obtención de ésteres etílicos en un sistema en discontinuo, usando como sustratos aceite de higuera y etanol en presencia de Lipozyme TL, IM, posibilita el desarrollo tecnológico de este proceso.

Tabla 16. Condiciones óptimas finales y comparación con otros trabajos que utilizan Lipozyme TL, IM

Variables	Éste trabajo	De Oliveira (2004)	Amado (2007)	Du (2003)	Wu (2003)	Soumanou (2003)	Castellanos (2004)	Du (2005)
Alcohol	Etanol	Etanol	Etanol	Metanol	Metanol	Metanol	Etanol	Metanol
Aceite	Higuerilla	Higuerilla	Palmiste	Soya	Aceite usado	Girasol	Palmiste	Soya
Solvente	---	n-hexano	---	---	---	---	---	---
Relación de sustratos (aceite: alcohol)	1:4,8	1:3	1:4	1:4	1:1 (adición en tres etapas)	1:1 (adición en tres etapas)	1:3	1:1 (adición en tres etapas)
Agitación	Propela: 150 rpm	Shaker: 200 rpm	Propela: 100 rpm	Shaker	130 rpm	Magnética: 200 rpm	Propela: 200 rpm	150 rpm
Temperatura	53,4 °C	65 °C	40 °C	40 °C	35 °C	40 °C	55 °C	40 °C
Cantidad de enzima	9 (% peso aceite)	20 (% peso aceite)	9 (% peso aceite)	30 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	6 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)
Tiempo de reacción	3,7 horas	8 horas	3 horas	12 horas	96 horas	30 horas	3 horas	48 horas
Rendimiento (% de ésteres)	97.48%	98%	97,8%	92%	90,2%	Aprox. 60%	67 %	Aprox. 92%
Productividad*	26,3	12,25	32.6	7.7	0.94	2.0	22,3	1.92
Productividad específica**	3,0	0,61	3.6	0.25	0.094	0.2	3,7	0.19

*% de ésteres / hora

**% de ésteres / hora * cantidad de enzima

Tabla 17. Comparación de resultados de la transesterificación del aceite de higuera

Variables	Este Trabajo	Mukesh (1993)	De Oliveira (2004)		Varma (2007)	Benavides (2007)	Meneghetti (2006)						
Alcohol	Etanol	n-butanol	Etanol		Metanol supercrítico	Etanol supercrítico	Metanol	Metanol			Etanol		
Catalizador	Lipozyme TL IM	Lipozyme IM-20	Lipozyme IM	Novozyme 435	Novozyme 435 en CO ₂ supercrítico	Novozyme 435 en CO ₂ supercrítico	NaOH	NaOCH ₃	KOCH ₃	H ₂ SO ₄	NaOCH ₃	KOCH ₃	HCl
Relación de sustratos (aceite:alcohol)	1:4,8	1:10	1:3	1:10	1:5	1:5	1:9	5:30	5:30	5:30	5:30	5:30	5:30
Agitación	Propela: 150 rpm	Magnética	200 rpm	200 rpm	---	---	---	Magnética	Magnética	Magnética	Magnética	Magnética	Magnética
Temperatura	53,4 °C	---	65 °C	65 °C	50 °C	45 °C	25 °C	60 °C	60 °C	60 °C	80 °C	80 °C	80 °C
Cantidad de catalizador	9 (% peso aceite)	5 (% peso aceite)	20 (% peso aceite)	20 (% peso aceite)	20 (% peso aceite)	20 (% peso aceite)	0,8 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)	10 (% peso aceite)
Tiempo de reacción	3,7 horas	45 Horas	6 horas	6 horas	8 horas	12 horas	2 horas	2 horas	1 hora	8 horas	6 horas	6 horas	8 horas
Rendimiento (Porcentaje de ésteres)	97.48%	85%	98%	73%	50%	37%	90%	85%	85%	85%	80%	75%	77%
Productividad*	26,3	1,9	16,3	12,2	6,3	3,1	45	42,5	85	10,63	13,3	12,5	9,63
Productividad específica**	3,0	0,4	0,82	0,61	0,3	0,15	56,3	4,2	8,5	1,1	1,3	1,3	0,96

*% de ésteres / hora

**% de ésteres / hora * cantidad de enzima

5. CONCLUSIONES

- La transesterificación enzimática del etanol y el aceite de higuera, utilizando la lipasa inmovilizada Lipozyme TL, IM permite la obtención de ésteres etílicos, con mínima contribución de subproductos y en condiciones suaves de operación.
- Con una cantidad de enzima de 9 % con respecto al peso del aceite, agitación de 150 rpm, temperatura de 53,4 °C, relación molar aceite/etanol 1:4,8 y un tiempo de reacción de 3.7 horas se alcanzan rendimientos de 97,48%, con índices de acidez de 0,49%.
- El valor obtenido de productividad en este trabajo es de 26,3 y productividad específica de 3,0; estos valores se encuentran dentro de los más altos reportados hasta el momento para la alcoholisis enzimática del aceite de higuera usando etanol, y hasta la fecha, el único trabajo del estudio del sistema aceite de higuera-etanol-Lipozyme TL, IM.
- El porcentaje de etil ésteres obtenido, la productividad y estabilidad del sistema, así como las suaves condiciones necesarias para la reacción, posibilitan el desarrollo tecnológico de este proceso a escala industrial.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda extender los estudios de obtención de ésteres alquílicos a partir de aceite de higuera por vía enzimática a una escala mayor y realizar una caracterización adecuada que garantice el ajuste del producto a las normas establecidas para biocombustibles. De ésta forma se logrará puntualizar su aplicación real, pues por tratarse de una tecnología limpia, se impone en la preservación del medio ambiente, manejo de productos de desecho y en la reducción de costos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADOLF, R. O. Separation of conjugated linoleic acid methyl esters by silver-ion high performance liquid chromatography in semi-preparative mode. En: Journal of Chromatography Applied. Vol. 1033 (2004); p. 369-371.
2. ABIGOR, R. D., et al. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. En: Biochemical Society. (2000); p. 979-981.
3. AGRA, I. B., et al. Two steps ethanolysis of castor oil using sulfuric acid as catalyst to produce motor oil. World Renewable Energy Congress IV. Colorado, U.S.A., 1996.
4. AL-WIDYAN, M. and AL-SHYOUKH, A. O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. En: Bioresource Technology. Vol. 85 (2002); p. 253-256.
5. AL-ZUHAIR, S., et al. High enzyme concentration model for the kinetics of hydrolysis of oils by lipase. En: Chemical Engineering Journal. Vol. 103 (2004); p. 7-11.
6. AL-ZUHAIR, S., et al. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. En: Process Biochemistry. Vol. 38 (2003); p. 1155-1163.
7. AMADO, D. María Antonia y RODRÍGUEZ, P. Erick. Estudio de la obtención de ésteres etílicos por transesterificación, usando lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus*. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, 2006.

8. AMADO, M. A. y RODRÍGUEZ, E. Obtención de biodiesel por transesterificación de aceite de palmiste utilizando lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. En: Revista Palmas. Vol. 28, No. 2 (2007); p. 23-28.
9. ANTOLÍN, G., et al. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. En: Bioresource Technology. Vol. 83 (2002); p. 111-114.
10. BARNWAL, B. K. and SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. En: Renewable & Sustainable Energy Reviews. Vol. 9 (2005); p. 363-378.
11. BOURNAY, L., et al. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. En: Catalysis Today. Vol. 106 (2005); p. 190-192.
12. CANOIRA, L., et al. Biodiesel from Jojoba oil-wax: transesterification with methanol and properties as a fuel. En: Biomasa & Energy. Vol. 30 (2006); p. 76-81.
13. CASTELLANOS, M. Fabián Enrique y GONZÁLEZ, S. Rosa Alexandra. Síntesis de ésteres alquílicos mediante alcoholisis el aceite de palmiste utilizando como catalizador lipasa de *Mucor miehei*. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, 2004.
14. CHEN, J. and WU, W. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* Lipase for transesterification. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 95, No. 5 (2003); p. 466-469.
15. CONCEIÇÃO, M. M., et al. Thermoanalytical Characterization of Castor Oil Biodiesel. En: Renewable & Sustainable Energy Reviews. Vol. 11 (2007); p. 964-975.

16. CONCEIÇÃO, M. M., et al. Dynamic Kinetic Calculation of Castor Oil Biodiesel. En: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol. 87 (2007); p. 865-869.
17. CRABBE, E., et al. Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. En: Process Biochemistry. Vol. 37 (2001); p. 65-71.
18. CVENGROS, J., et al. Properties of alkyl esters base on castor oil. En: European Journal of Lipid Science and Technology. Vol. 108 (2006); p. 629-635.
19. DANTAS, M. B., et al. Characterization and kinetic compensation effect of corn biodiesel. En: Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol. 87 (2007); p. 847-851.
20. DEMIRBAS, Ayhan. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. En: Progress in Energy and Combustion Science. Vol. 31 (2005); p. 466-487.
21. DE OLIVEIRA, D., et al. Optimization of Enzymatic Production of Biodiesel from Castor Oil in Organic Solvent Medium. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 113–116 (2004); p. 771-780.
22. DESAI, P. D., et al. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. En: Food Chemistry. Vol. 95 (2006); p. 193-199.
23. DOSSAT, V., et al. Efficient Lipase Catalysed Production of a Lubricant and Surfactant Formulation Using a Continuous Solvent-free Process. En: Journal of Biotechnology. Vol. 97 (2002); p. 117-124.

24. DOSSAT, V., et al. Lipase-Catalysed Transesterification of High Oleic Sunflower. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 30 (2002); p. 90-94.
25. DU, W., et al. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. En: Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 38 (2003); p. 103-106.
26. DU, W. et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 37 (2005); p. 68-71.
27. FUKUDA, Hideki, et al. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 92 (2001); p. 405-416.
28. GHADGE, S. V. and RAHEMAN, H. Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. En: Bioresource Technology. Vol. 97 (2006); p. 379-384.
29. GRAILLE, J. Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. En: OCL. Vol. 6, No. 5 (1999); p. 365-372.
30. ILLANES, A. Biotecnología de enzimas. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso (1994); p. 179-190.
31. ISO, M., et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 16 (2001); p. 53-58.
32. KIM, H-J., et al. Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst. En: Catalysis Today. Vol. 93-95 (2004); p. 315-320.

33. KÖSE, Ö., et al. Immobilized *Candida Antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. En: Bioresource Technology. Vol. 83 (2002); p. 125-129.
34. LARA, A., et al. Lipase Catalyzed Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Contained in Waste Activated Bleaching Earth. En: Process Biochemistry. Vol. 38 (2003); p. 1077-1082.
35. MA, F. and HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. En: Bioresource Technology. Vol. 70 (1999); p. 1-15.
36. MEHER, L. C., et al. Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification—a review. En: Renewable & Sustainable Energy Reviews. (2004); p.1-21.
37. MENEGHETTI, S. M., et al. Biodiesel from Castor Oil: A Comparison of Ethanolysis versus Methanolysis. En: Journal of Energy & Fuels. Vol. 20 (2006a); p. 2262-2265.
38. MENEGHETTI, S. M., et al. Ethanolysis of Castor and Cottonseed Oil: A Systematic Study Using Classical Catalysts. En: JAOCS. Vol. 83 (2006b); p. 819-822.
39. MODI, M. K., et al. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. En: Biotechnology Letters. Vol. 28 (2006); p. 637-640.
40. MUKESH, D., et al. Lipase Catalysed Transesterification of Castor Oil. En: Biotechnology Letters. Vol. 15 (1993); p. 251-256.

41. NANDI, S., et al. production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase-catalyzed reactions. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 36 (2005); p. 725-728.
42. NELSON, L. A., et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel. En: JAOCS. Vol. 73, No. 8 (1996); p. 1191-1195.
43. NOUREDDINI, H., et al. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. En: Bioresource Technology. Vol. 96 (2005); p. 769-777.
44. OLIVEIRA, D. and OLIVEIRA, J. V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in *n*-hexane and SCCO₂. En: Journal of supercritical fluids. Vol. 19 (2001); p. 141-148.
45. OGUNNIYI, D.S., Castor Oil: A vital industrial raw material. En: Bioresource Technology. Vol. 97 (2006); p. 1086-1091.
46. ORÇAIRE, O., et al. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. En: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 42 (2006); p. 106–113.
47. SALIS, A. et al. Industrial Enzymes. Charpet 19. Use of Lipases for the Production of Biodiesel. J. Polonia and A.P. MacCabe (eds). 2007; p. 317-339.
48. SELMI, B. and THOMAS, D. Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent-Free Medium. En: JAOCS. Vol. 75, No. 6 (1998); p. 691-695.

49. SHAH, S., et al. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. En: Energy and fuels. Vol. 18 (2004); p. 154-159.
50. SHIEH, C. J., et al. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. En: Bioresource Technology. Vol. 88 (2003); p. 103-106.
51. SHIMADA, Y., et al. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida Antarctica* Lipase. En: JAOCS, Vol. 76, No. 7 (1999); p. 789–793.
52. SOUMANOU, M. M. and BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 33, No. 1 (2003); p. 97-103.
53. SUEHARA, K-I., et al. Biological Treatment of Wastewater Discharged from Biodiesel Fuel Production Plant with Alkali-Catalyzed Transesterification. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 100, No. 4 (2005); p. 437-442.
54. TORRES, C. F., et al. Lipase-catalyzed ethanolysis of Borage oil: a kinetic study. En: Biotechnol. Prog. Vol. 20 (2004); p. 756-763.
55. VARMA, M. and MADRAS, G. Synthesis of Biodiesel from Castor Oil and Linseed Oil in Supercritical Fluids. En: J. Ind. Eng. Chem. Vol. 46 (2007); p. 1-6.
56. WILSON, R., SARGENT, J. R. Chain separation of monounsaturated fatty acid methyl esters by argentation thin-layer chromatography. En: Journal of Chromatography Applied. Vol. 905 (2001); p. 251-257.

57. WU, H., et al. Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in a solvent-free system. En: Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem. Vol. 48, No. 2 (2003); p. 533-534.

58. www.corpoica.org.co

59. XU, Y., et al. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. En: Biotechnology Letters. Vol. 25 (2003); p. 1239-1241.

60. ZHENG, S., et al. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. En: Biomass & Energy, 2005.

ANEXOS

Anexo A. Perfil cromatográfico del producto de la reacción de alcoholisis en condiciones óptimas (97,48% de etil ésteres).

