

**Producción de biodiesel de piñón (*Jatropha curcas*) y palma africana (*Elaeis guineensis*)
con dos enzimas derivadas de *Candida antarctica***

Luis Enrique Moreno Muñoz

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Producción de biodiesel de piñón (*Jatropha curcas*) y palma africana (*Elaeis guineensis*)
con dos enzimas derivadas de *Candida antarctica***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Luis Enrique Moreno Muñoz

Zamorano Honduras

Noviembre, 2013

Producción de biodiesel de piñón (*Jatropha curcas*) y palma africana (*Elaeis guineensis*) con dos enzimas derivadas de *Candida antarctica*

Presentado por:

Luis Enrique Moreno Muñoz

Aprobado:

Francisco Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Renán Pineda, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Producción de biodiesel de piñón (*Jatropha curcas*) y palma africana (*Elaeis guineensis*) con dos enzimas derivadas de *Candida antarctica*.

Luis Enrique Moreno Muñoz

Resumen: Este estudio evaluó el rendimiento y características físico-químicas del biodiesel de piñón (*Jatropha curcas*) y palma africana (*Elaeis guineensis*) utilizando dos catalizadores enzimáticos (Callera Trans L y Novozym 435) vs. un catalizador básico (NaOH). Se utilizaron las condiciones óptimas. Se utilizó un DCA con un arreglo factorial 2×3 , con tres repeticiones. Se utilizó un ANDEVA y separación de medias LS Means cuando hubo interacción y separación de medias Tukey cuando no hubo interacción con significancia de 0.05 en el programa SAS 9.1. Se evaluó rendimiento, humedad, porcentaje de ácidos grasos libres (AGL), índice de peróxidos, índice de estabilidad oxidativa (OSI), color y perfil de ácidos grasos utilizando métodos oficiales de la AOCS, AOAC y ASTM. El porcentaje de biodiesel fue afectado por la fuente de biodiesel ($P=0.02$). El biodiesel de *Jatropha curcas* usando Callera Trans L presentó un rendimiento de 83.4% (g de biodiesel/100 g de aceite) estadísticamente igual ($P=0.87$) a Novozym 435 (82.8%) y ($P=0.05$) a NaOH (74.7%). El biodiesel de palma africana usando Novozym 435 presentó un rendimiento de 75.3% estadísticamente igual ($P=0.52$) a Callera Trans L (72.7%) y ($P=0.52$) a NaOH (72.6%). Ninguno de los tratamientos que utilizaron catálisis enzimática cumplió con los parámetros establecidos por la norma ASTM D6751. Los tratamientos que utilizaron NaOH cumplieron con los parámetros establecidos por la norma ASTM D6751 para porcentaje de AGL y OSI. Se recomienda hacer estudios a escala de planta piloto y mejorar la cuantificación de ésteres monoalquílicos incluyendo un estándar interno en el análisis cromatográfico.

Palabras clave: Análisis cromatográfico, ASTM D6751, Callera Trans L, catálisis enzimática, Novozym 435.

Abstract: This study evaluated the performance and physicochemical characteristics of biodiesel produced from *Jatropha* (*Jatropha curcas*) and palm oil (*Elaeis guineensis*) using two enzymatic catalysts (Callera Trans L and Novozym 435) vs. a basic catalyst (sodium hydroxide). Optimal conditions were used for each treatment. DCA was used with a 2×3 factorial arrangement, with three replicates. We used an ANOVA and mean separation LS Means when there was interaction and Tukey mean separation when there was no interaction with significance of 0.05 using SAS 9.1. We evaluated performance, humidity, percentage of free fatty acids (FFA), peroxide value, oxidative stability index (OSI), color and fatty acid profile using the AOCS, AOAC and ASTM official methods. The biodiesel yield was affected only by the source of biodiesel ($P=0.02$). Biodiesel from *Jatropha curcas* using Callera Trans L showed an 83.4% yield (g of biodiesel/ 100 g of oil) statistically similar ($P=0.87$) to Novozym 435 (82.8%) and ($P=0.05$) to NaOH (74.7%). Biodiesel from palm oil using Novozym 435 showed a 75.3% yield statistically similar ($P=0.52$) to Callera Trans L (72.7%) and ($P=0.52$) to NaOH (72.6%). None of the treatments which used enzymatic catalysis met the parameters set by ASTM D6751. The treatments which used NaOH met the standards established by ASTM D6751 only FFA percentage and OSI. Studies at pilot plant scale are recommended and better

quantification of the monoalkyl esters produced by the transesterification including an internal standard for gas chromatographic analysis.

Key words: ASTM D6751, Callera Trans L, enzymatic catalysis, Gas chromatography analysis, Novozym 435.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4 CONCLUSIONES.....	22
5 RECOMENDACIONES.....	23
6 LITERATURA CITADA.....	24
7 ANEXOS.....	29

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Norma de calidad para aceites vegetales DIN V 51 605	3
2. Norma de calidad para biodiesel ASTM D6751	3
3. Condiciones del proceso de producción de biodiesel para cada tratamiento.	7
4. Efecto de los factores sobre el rendimiento del biodiesel.	11
5. Rendimientos de aceite semi-refinado a biodiesel.	12
6. Porcentaje de ésteres monoalquílicos con respecto al control.....	14
7. Efecto de los factores en la estabilidad oxidativa del biodiesel.	15
8. Humedad y estabilidad oxidativa del biodiesel.	15
9. Efecto de los factores sobre los valores de L a y b del color del biodiesel.	17
10. Valor L para el color del biodiesel por cada fuente de biodiesel.	18
11. Valor L para el color del biodiesel por cada catalizador.	18
12. Valores a y b para el color del biodiesel.....	19
13. Efecto del catalizador sobre el perfil de ácidos grasos del biodiesel de <i>Jatropha curcas</i>	20
14. Efecto del catalizador sobre el perfil de ácidos grasos del biodiesel de palma africana	21

Figuras	Página
1. Actividad de enzima Novozym 435 y Callera Trans L en términos de producción de AGL en aceite de <i>Jatropha curcas</i>	10

Anexos	Página
1. Análisis físico químico del aceite de <i>Jatropha curcas</i> . utilizado para la elaboración del biodiesel.	29

2. Análisis físico químico del aceite de palma africana utilizado para la elaboración de biodiesel.	30
3. Proceso ilustrado del proceso de producción de biodiesel con Callera Trans L como catalizador.....	32
4. Proceso ilustrado del proceso de producción de biodiesel con Novozym 435 como catalizador.....	33
5. Proceso detallado para recuperación de enzima Novozym 435.	34

1. INTRODUCCIÓN

El biodiesel, definido como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga, es derivado de aceites vegetales o aceites animales. La forma más común de producir biodiesel es por la reacción química de triglicéridos con alcoholes de cadena corta, para formar ésteres monoalquílicos de ácidos grasos y glicerol (Al-Zuhair 2007).

Para acelerar este proceso se emplea convencionalmente un catalizador básico, Espinal (2012) obtuvo rendimientos de 90.6% utilizando aceite de *Jatropha curcas* y NaOH como catalizador a sus condiciones óptimas que fueron: cantidad de NaOH = 1% (con respecto al peso del aceite), relación molar = 6:1, temperatura de reacción = 60°C, tiempo de reacción = 60 minutos y agitación = 400 rpm. Por otro lado, Avellaneda Vargas (2010) obtuvo rendimientos de biodiesel de palma africana de 72% utilizando NaOH como catalizador a sus condiciones óptimas que fueron: cantidad de NaOH = 1% (con respecto al peso del aceite), relación molar = 6:1, temperatura de reacción = 60 °C, tiempo de reacción = 60 minutos y agitación = 400 rpm.

Una desventaja importante de este método es la dificultad para transesterificar ácidos grasos libres (AGL) presentes en gran cantidad en aceites vegetales y aceites usados (Juan *et al.* 2011; Meher *et al.* 2006; Gerpen 2005). Un tratamiento previo es necesario para reducir la cantidad de AGL y evitar la saponificación durante la transesterificación alcalina. La saponificación reduce rendimientos y dificulta la separación de fases (Espinal 2012; Meher *et al.* 2006).

Se ha reportado varios métodos alternativos en el que se usa lipasas extraídas de diferentes microorganismos como catalizador del proceso de transesterificación para producción de biodiesel (Cesarinia *et al.* 2013; Azócar *et al.* 2012; Su *et al.* 2011; Azócar *et al.* 2010; Kumari *et al.* 2009; Tamalampudia *et al.* 2008; Modi *et al.* 2007; Robayo 2005; Shimadaa *et al.* 1999). La catálisis enzimática, al contrario de la catálisis alcalina, no produce jabón y permite la transesterificación completa tanto de AGL como de triglicéridos, lo que aprueba la utilización de aceites vírgenes y aceites usados con alto contenido de AGL (Fjerbaek *et al.* 2009). Una de las principales desventajas de la catálisis enzimática es el costo elevado de la enzima, por lo que es necesario su reutilización para la dilución de estos costos (Cesarinia *et al.* 2013). El proceso enzimático se ve afectado por varios factores que son: relación aceite-metanol, velocidad de agitación, temperatura de reacción, tiempo de reacción, cantidad de agua y concentración de enzima.

Novozym 435 es una lipasa comercial (Novozymes) proveniente de *Candida antarctica* inmovilizada en resina de acrílico (Azócar 2010), Novozym 435 ha sido muy estudiada

por sus altos índices de rendimiento y su capacidad de reutilización. Su *et al.* (2010) evaluó tres enzimas comerciales y determinó la enzima más eficiente para la producción de biodiesel a partir de aceite de *Jatropha curcas*. Novozym 435 presentó rendimientos > 94% en peso, bajo las condiciones óptimas que fueron: tiempo de reacción = 13.3h, temperatura = 44.5 °C, cantidad de enzima = 13.7% (con respecto al peso del aceite), relación molar = 3.75:1 y cantidad de agua = 0. Las tres enzimas evaluadas fueron Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, y Novozym 435.

Callera Trans L es una nueva enzima (lipasa) comercial (Novozymes) soluble proveniente de *Candida antarctica*, la ventaja de esta enzima es su bajo costo de producción pues no requiere un proceso de inmovilización (enzima libre) (Cesarinia *et al.* 2013). Cesarinia *et al.* (2013) realizó un estudio de optimización de proceso utilizando Callera Trans L como catalizador en la producción de biodiesel a partir de aceite de soya. La enzima presentó rendimientos > 95% bajo condiciones óptimas que fueron: temperatura de reacción = 35°C, tiempo de reacción = 24h, agitación = 200 rpm, cantidad de enzima = 1% con respecto al peso del aceite, metanol = 16% con respecto al peso del aceite y cantidad de agua = 5% con respecto al peso del aceite.

El cultivo de piñón (*Jatropha curcas*) es un arbusto perteneciente a la familia de las Euforbiáceas que presenta semillas con alto contenido de lípidos por lo que es una alternativa para la producción de biodiesel (Heller 1996). La semilla y la torta de *Jatropha curcas* presentan toxicidad que se le atribuye a los ésteres de forbol, inhibidores de tripsina y amilasa, saponinas, lecitinas y fitatos; esto imposibilita su consumo humano y animal (Bermejo *et al.* s.f.; Tamalapundia *et al.* 2008; Haas *et al.* 2000; Wink *et al.* 2000).

Espinal (2012) evaluó la composición de la semilla y la calidad del aceite de tres variedades de *Jatropha curcas*, para la variedad de Cabo Verde reportó un contenido de lípidos >49%, superior a las variedades Criolla Mexicana e Hindú Salvadoreña con 48,1% y 43.6% respectivamente, reportó rendimientos de aceite crudo para la variedad de Cabo Verde de 29% superior a las variedades Criolla Mexicana e Hindú Salvadoreña con rendimientos de 28% y 27% respectivamente.

La palma africana o de aceite (*Elaeis guineensis*), es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las Palmaceae, el fruto de este cultivo presenta un rendimiento de alrededor del 25% de aceite crudo lo que hace que sea un cultivo atractivo para la producción de biodiesel (Mingorance *et al.* 2004). La producción hondureña de palma africana según SAG (2013) es de 120 000 Has. con una producción de aceite de 400 000 TM anuales.

Para el proceso de producción de biodiesel es necesario contar con materia prima de calidad, el aceite semi-refinado de *Jatropha curcas* y aceite semi-refinado de palma fueron analizados en términos de calidad basándose en la norma del Instituto de Estandarización Alemán DIN V 51 605 (Cuadro 1) que establece parámetros físico-químicos para la calidad de aceites vegetales que serán usados en la producción de combustibles de segunda generación.

Cuadro 1. Norma de calidad para aceites vegetales DIN V 51 605

Parámetro	Límites	Unidades
Humedad	Max. 0.075	%
Ácidos grasos libres	Max. 2.0	Mg KOH/g
Índice de yodo	95-125	g yodo/100g
Índice de cetano	Min. 39	
Densidad (15°C)	900-930	Kg/m ³
Viscosidad cinemática (40°C)	Max. 36	mm ² /s
Estabilidad oxidativa	Min. 6	Horas
Energía bruta	Min. 860	cal/100g

Fuente: Second generation vegetable oil fuels (2011).

El presente estudio, se centró en comparar rendimientos y calidad en biodiesel de las dos enzimas a utilizar en la catálisis de dos tipos de aceite (*Jatropha curcas* y Palma africana) en sus condiciones óptimas. Los parámetros de calidad fueron comparados con los parámetros establecidos por la norma ASTM D6751.

Cuadro 2. Norma de calidad para biodiesel ASTM D6751

Parámetro	Método	Límite	Unidades
Agua y Sedimentos	D2709	0.05 Max.	% volumen
Viscosidad Cinemática 40°	D445	1.9-6.0	mm ² /s
Índice de cetanos	D613	47	Min
Valor de acidez	D664	0.5 Max.	mg de KOH/g
Estabilidad Oxidativa	EN 15751	3	Horas

Se establecieron como objetivos del estudio:

- Comparar rendimientos del biodiesel resultante de la transesterificación de aceite de *Jatropha curcas* y palma africana utilizando dos enzimas (Novozym 435 y Callera Trans L) vs. una base (hidróxido de sodio).
- Comparar las características físicas y químicas del biodiesel de aceite de *Jatropha curcas* y palma africana utilizando dos enzimas (Novozym 435 y Callera Trans L) vs. una base (hidróxido de sodio), con los parámetros establecidos por la norma ASTM D6751.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización: Este estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), ubicado a 30 kilómetros al este de Tegucigalpa Honduras.

Diseño del estudio. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3×2 . Como parte de arreglo factorial se evaluaron dos tipos de aceite (*Jatropha curcas* y palma africana) y tres tipos de catalizadores (NaOH, Novozym 435 y Callera Trans L). Se realizó una separación de medias LSD cuando no hubo interacción entre los factores y LS Means cuando hubo interacción. En total se analizaron 6 tratamientos. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento lo que resultó en 18 unidades experimentales. Los parámetros evaluados fueron rendimiento de biodiesel y estabilidad oxidativa.

Extracción de aceite de *Jatropha curcas*. El aceite de *Jatropha curcas* fue obtenido en el proyecto BYSA de la Fundación FUNDER de Yoro. Fueron tres litros de aceite, resultado de tres extracciones separadas por tiempo realizadas el 21 de agosto de 2013, la variedad de la semilla utilizada fue Cabo Verde. Según Espinal (2012) la variedad Cabo Verde es la que presentó mayor potencial para la extracción de aceite debido a su alto contenido de lípidos en semilla.

Extracción de ceite de palma. El aceite de palma fue donado por la empresa Hondupalma S.A. Se envió un total de 3 L, cada L fue tomado aleatoriamente de la producción de los últimos 15 días del mes de Agosto de 2013.

Neutralizado de aceite de *Jatropha curcas*. El método de neutralizado de aceite se realizó en el aceite de *Jatropha curcas* por no cumplir con el rango de AGL. Se siguió el método detallado por Wan *et al.* (1997) Mis (2008) y Espinal (2012). Primero se determinó el porcentaje de AGL para determinar los aceites que no cumplieron con los parámetros de calidad de aceites vegetales de la norma del Instituto de estandarización alemán DIN V 51 605 (Max. 2.0 mg KOH/g). El procedimiento realizado fue el siguiente: se pesó el aceite y se determinó mediante la Ecuación 2 el porcentaje de NaOH 1M (solución neutralizante) a utilizar, esta ecuación utiliza una relación del peso molecular de NaOH (40g/mol) por el peso molecular del ácido oleico libre (282 g/mol) indicado en la Ecuación 1 más un ajuste de 0.175%. La cantidad de NaOH fue diluida al 10% en agua destilada y se mezcló el aceite y la solución a temperatura ambiente durante 20 min con agitación constante a 400 rpm. Luego se colocó el aceite en la centrífuga durante 20 minutos a 2500 rpm teniendo como resultado una separación de fases en la que la fase sobrenadante fue el aceite y la fase inferior los ácidos grasos saponificados. Se extrajo la

fase sobrenadante (aceite) y se lavó con agua destilada a 80°C (1/3 del peso de aceite). Se realizaron lavados hasta que el agua residual fuese transparente, los ácidos grasos saponificados fueron desechados. Finalmente se secó el aceite a 105°C por 24h.

$$\text{Relación molar NaOH} - \text{Ácido graso Oleico} = 0.142 \quad [1]$$

$$\% \text{ de NaOH} = \% \text{ de AGL} \times 0.142 + 0.175 \quad [2]$$

Análisis de calidad del aceite. Para determinar la calidad del aceite y seguir con el proceso de producción de biodiesel, se usó los parámetros de calidad de aceite de la norma del Instituto de estandarización alemán DIN V 51 605, se realizaron análisis por duplicado para las tres repeticiones de cada tipo de aceite. Los análisis realizados se detallan a continuación:

Determinación de humedad AOCS Ca 2e-84 (% de humedad). El porcentaje de humedad del aceite fue determinado mediante el método Karl Fischer (787 Titrino, Metrohm) que arroja la cantidad de humedad expresada en porcentaje en base al peso del aceite. Se evaluó la humedad de cada repetición por duplicado y se determinó si el aceite está en el rango permitido según la norma del Instituto de estandarización alemán DIN V 51 605 (2007), que permite hasta un 0.0750 % de humedad.

Determinación de color (L a b). Se determinó el color del aceite semi-refinado a través del Colorflex modelo EZ 45/0 (Hunterlab) y los resultados se reportaron según los componentes de L, a y b de cada muestra. Se realizó el análisis por duplicado para las 6 unidades experimentales.

Ácidos grasos libres AOCS Ca 5a-40 (% de ácidos grasos libres). Se realizó un análisis de ácidos grasos libres para cada repetición de aceite por duplicado. Se utilizó una titulación con hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración determinada, se utilizó fenoltaleína como indicador de neutralidad. Según la norma del Instituto de estandarización alemán DIN V 51 605, el máximo permitido de ácidos grasos libres en un aceite vegetal es de 2 mg KOH/g de muestra. Dependiendo de los resultados se determinó la necesidad del proceso de neutralizado que elimina los ácidos grasos libres mejorando la calidad de las muestras. Los resultados fueron reportados como porcentaje de ácido oleico para el aceite de *Jatropha curcas* y como porcentaje de ácido palmítico para el aceite de palma africana.

Estabilidad oxidativa AOCS Cd 12b-92 (h de inducción). Determina el tiempo de vida anaquel de los aceites exponiéndolos a situaciones propicias para la oxidación usando temperatura controlada (110°C) y oxigenación (9 litros por hora) en el Rancimat (873 Metrohm). Los resultados fueron reportados en horas de inducción y fueron comparados con la norma del Instituto de estandarización alemán DIN V 51 605 que establece un límite mínimo de 6 horas de inducción para aceites vegetales de calidad. Se realizó el análisis por duplicado a cada repetición.

Perfil de ácidos grasos AOCS Ce 2b-11 (%). Esta prueba permitió determinar la concentración en porcentaje de ácido graso. Se realizó en el cromatógrafo de gases modelo 7890 A (Agilent). Para la identificación de cada ácido graso se utilizó el estándar GLC-463, la integración del área bajo la curva permitió saber la concentración de cada ácido graso. Se evaluó el análisis por duplicado para las 6 unidades experimentales.

Prueba de actividad de enzimas. Se adaptó el método descrito por Rose y Pike (2006). Esta prueba se realizó para cada enzima en la que se determinó el porcentaje de AGL liberados por el método AOCS Ca 5a-40 a las 0, 6, 18 y 24 horas para la enzima Callera Trans L; y a las 0, 4, 8, y 12 horas para la enzima Novozym 435. Se utilizó las condiciones óptimas para cada enzima (Cuadro 3) con base en 30 g de aceite de *Jatropha curcas*, no se utilizó metanol para la prueba porque se midió el producto de la enzima en valores de AGL. Cada determinación de AGL se realizó por triplicado.

Prueba de concentración óptima de enzimas. Se adaptó el método descrito por Rose y Pike (2006). Esta prueba se realizó para cada enzima en la que se determinó el porcentaje de AGL liberados por el método AOCS Ca 5a-40 a concentraciones de 0, 0.5, 1 y 2% (con respecto al aceite) para la enzima Callera Trans L; y a concentraciones de 0, 7, 12 y 14% (con respecto al aceite) para la enzima Novozym 435. Se utilizó las condiciones óptimas para cada enzima (Cuadro 3) con base en 30 g de aceite de *Jatropha curcas*, no se utilizó metanol para la prueba porque se midió el producto de la enzima en valores de AGL. Cada determinación de AGL se realizó por triplicado.

Elaboración de biodiesel. Para cada tratamiento se utilizó las condiciones óptimas reportadas en el Cuadro 3 para la reacción. Terminado el tiempo de reacción se adicionó a la mezcla 1/3 de agua destilada a 80°C con respecto al aceite manteniendo la agitación constante en el calentador modelo Cimerec (Fisher Scientific). La separación de fases se realizó por centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos en la centrífuga modelo K 115 (IEC) (Gunstone *et al.* 1993; Wan *et al.* 1997; Mis 2008), la fase sobrenadante (biodiesel) fue extraída y sometida a dos lavados con 1/3 de agua destilada a 50°C con respecto al peso del aceite (González 2012). Finalmente se secó el biodiesel por 24 horas a 105°C en el horno de aire forzado Fisher Scientific.

Cuadro 3. Condiciones del proceso de producción de biodiesel para cada tratamiento.

Catalizador	Aceite	Concentración catalizador (% p/pa)	Relación Molar (metanol-aceite)	Agua (% p/pa)	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (h)	Agitación (rpm)
NaOH	Jatropha	1	6-1	0	60	1	400
	Palma	1	6-1	0	60	1	400
Novozym 435	Jatropha	14	3-1	0	40	14	200
	Palma	14	3-1	0	40	14	200
Callera Trans L	Jatropha	1	1.5-1	5	40	24	200
	Palma	1	1.5-1	5	40	24	200

% p/pa = porcentaje en peso en base al peso del aceite.

Rendimiento de biodiesel (%). El porcentaje de biodiesel obtenido por cada unidad experimental se determinó con la Ecuación 3.

$$\% \text{ de Rendimiento de biodiesel} = \frac{g \text{ de biodiesel obtenido}}{g \text{ de aceite utilizado}} \times 100 \quad [3]$$

Porcentaje de glicerina (%). El porcentaje de glicerina por unidad experimental producto de la transesterificación de ácidos grasos se determinó con la Ecuación 4.

$$\% \text{ de Glicerina} = \frac{\Sigma \text{ de } (g) \text{ de glicerina} - \Sigma \text{ de agua utilizada (g)}}{g \text{ de aceite utilizado}} \times 100 \quad [4]$$

Porcentaje de ésteres monoalquílicos (FAME) (% de FAME con respecto al control). Se utilizó el método AOCS Ce 2b-11 en el cromatógrafo de gases modelo 7890 A (Agilent). El estándar utilizado para calcular el porcentaje de FAME fue el GLC-463. Al no existir un estándar para biodiesel se realizó un porcentaje de FAME con respecto al control (catalizador básico), Ecuación 5. La sumatoria de la integración del área bajo la curva permitió determinar el porcentaje de FAME obtenido para los tratamientos que utilizaron enzima como catalizador. Se realizó el análisis por duplicado para cada unidad experimental.

$$\% \text{ de FAME con respecto al control} = \frac{\Sigma \text{ área bajo la curva del tratamiento}}{\Sigma \text{ área bajo la curva del control}} \times 100 \quad [5]$$

Perfil de ácidos grasos AOCS Ce 2b-11 (%). El análisis se realizó por cromatografía de gases en el cromatógrafo de gases modelo 7890 A (Agilent) y no se transesterificó porque las muestras (biodiesel) estaban previamente transesterificadas (González 2012). Se utilizó el estándar GLC-463. La integración del área bajo la curva de los cromatogramas permitió determinar la concentración en porcentaje de cada ácido graso. Se realizó el análisis por duplicado para cada unidad experimental.

Determinación de color (L a b). Se utilizó el Colorflex modelo EZ 45/0 (HunterLab) y los resultados se reportaron según los componente de L, a y b para cada muestra. Se realizó el análisis por duplicado para cada unidad experimental.

Determinación de humedad AOCS Ca 2e-84 (% de humedad). Se determinó la humedad del aceite por el método de Karl Fischer modelo 787 Titrino (Metrohm) que arroja resultados de humedad en porcentaje con respecto al peso del biodiesel. El límite máximo establecido por la norma ASTM D6751 es de 0.05%. Se realizó el análisis por duplicado para cada unidad experimental.

Determinación de ácidos grasos libres AOCS Ca 5a-40 (% de ácidos grasos libres). Los resultados fueron reportados como porcentaje de ácido oleico para el biodiesel de *Jatropha curcas* y como porcentaje de ácido palmítico para el biodiesel de palma africana. Se utilizó una titulación con hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración determinada, se utilizó fenolftaleína como indicador de neutralidad. El parámetro máximo establecido para AGL por la norma ASTM D6751 es de 0.25% de ácidos grasos libres. Se realizó el análisis por duplicado para cada unidad experimental.

Índice de peróxidos AOCS Cd 8b-90 (meq/1000g). Este análisis indica el grado de oxidación del biodiesel. Se utilizó titulación con tiosulfato pentahidratado 0.1 M. La norma ASTM D6751 no establece un límite para este análisis. Se realizó la prueba por duplicado para cada unidad experimental.

Estabilidad oxidativa AOCS Cd 12b-92 (h de inducción). Se realizó con el Rancimat modelo 873 (Metrohm), la prueba consiste en someter el biodiesel a condiciones de oxidación acelerada usando temperatura controlada (110°C) y oxigenación (9 litros por hora). Los resultados fueron reportados en horas de inducción. La norma ASTM D-6751 establece un límite mínimo de tres horas de inducción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad del aceite.

Para la producción de biodiesel en condiciones óptimas, es necesario ajustar la calidad del aceite (aceite de *Jatropha curcas* y aceite de palma africana) con los parámetros establecidos por el Instituto Alemán de Estandarización en su norma DIN V51605. Las tres unidades experimentales de aceite de palma africana utilizadas en este estudio cumplieron con los parámetros de calidad establecidos por la norma para la elaboración de biodiesel. Las tres unidades experimentales de aceite de *Jatropha curcas* se excedieron en términos de %AGL, por lo que se realizó un proceso de neutralizado (Espinal 2012, Mis 2008) para reducir el %AGL y alcanzar los parámetros de calidad establecidos por la norma DIN V51605.

Para el aceite de *Jatropha curcas* de la variedad Cabo Verde solo se encontraron diferencias estadísticas para Luminosidad (L) con una probabilidad menor a 0.05; los demás análisis realizados no mostraron diferencias estadísticas entre extracciones. Para el aceite de palma africana no se encontraron diferencias estadísticas entre extracciones.

La utilización de lipasas para producción de biodiesel ha sido muy estudiada debido a las ventajas que esta alternativa presenta en comparación a la catálisis básica, entre las ventajas más importantes están: la facilidad de recuperación de la glicerina, la formación nula de jabón durante la reacción y el menor uso de agua en lavado (Tamalapundia *et al.* 2007).

Múltiples estudios han reportado que la enzima comercial Novozym 435 (Novozymes®) ha sido una de las enzimas más exitosas en producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (Azócar 2012; Azócar 2010; Su *et al.* 2010).

La enzima Callera Trans L es una nueva lipasa soluble desarrollada por Novozymes®, Cesarinia *et al.* 2013 reportó rendimientos > 95% de biodiesel de aceite crudo de soya usando Callera Trans L como catalizador.

Pruebas de actividad de las enzimas.

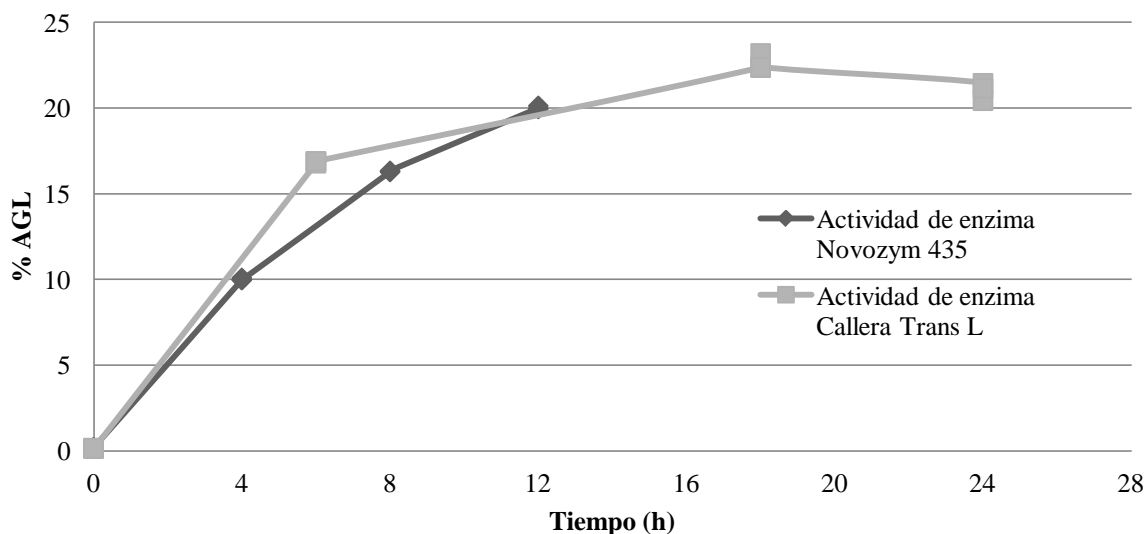


Figura 1. Actividad de enzima Novozym 435 y Callera Trans L en términos de producción de AGL en aceite de *Jatropha curcas*.

En el análisis de actividad enzimática realizado a las condiciones descritas en el Cuadro 3 la enzima Novozym 435 presentó una producción de AGL alta en las primeras 4 horas de reacción (Figura 1), en el intervalo de 4 a 8 horas la producción de AGL disminuyó, finalmente en las últimas 4 horas de reacción (8 – 12h) la tasa de producción de AGL fue la menor. Estos resultados fueron similares a los de Azócar (2012) que reportó que la mayor actividad enzimática de Novozym 435 fue en las 10 primeras horas, luego de las cuales la actividad enzimática se redujo a valores similares a 0. Esta disminución de la actividad de la enzima pudo deberse a la inhibición competitiva que genera el producto en la relación enzima – sustrato (Fennema 1993). La actividad enzimática de Novozym 435 tuvo un comportamiento similar a lo presentado por Azócar (2012) por lo que se escogió el mismo tiempo de reacción para este estudio (14 h).

La enzima Callera Trans L reportó la mayor actividad en las primeras 6 horas, en el periodo siguiente de 12 horas (6 – 18 horas) la actividad enzimática se redujo, finalmente en las últimas 6 horas se pudo observar una actividad enzimática inversa, es decir, el % de AGL en el aceite disminuyó en 1.5 unidades. Esto pudo deberse a que las reacciones enzimáticas son reversibles y la reacción inversa se ve favorecida al irse acumulando el producto. Cesarinia *et al.* 2013 reportó que la mayor actividad enzimática en términos de ésteres monoalquílicos se presentó en las 6 primeras horas de reacción, después de este tiempo la tasa de actividad disminuyó considerablemente. La actividad enzimática de Callera Trans L tuvo un comportamiento similar a lo presentado por Cesarinia *et al.* 2013 por lo que se escogió el mismo tiempo de reacción para este estudio (24 h).

Un factor que pudo haber determinado la disminución de la actividad enzimática (Novozym 435 y Callera Trans L) en el tiempo pudo ser la inhibición de la enzima por

parte del glicerol (Bélafi-Bakó *et al.* 2002) ya que ésta adsorbe la enzima lo que conlleva a una disminución de la actividad enzimática formando menos AGL por tiempo.

Rendimiento de biodiesel. El rendimiento de producción de biodiesel ha sido un área de mucho estudio para optimizar procesos, se ha estudiado todos los factores que influyen en el rendimiento y se han reportado las condiciones óptimas para el catalizador básico y para las dos enzimas utilizadas (Goyal *et al.* 2012; Nakpong y Wootthikanokkhan 2010; Kywe y Oo 2009; Avellaneda Vargas 2010; Rios *et al.* 2009; Chongkhong *et al.* 2007; Azócar 2012; Azócar 2010; Su *et al.* 2009; Shimadaa *et al.* 2009; Cesarinia *et al.* 2013).

El único factor que afectó significativamente el rendimiento de biodiesel y el rendimiento de glicerina fue el tipo de aceite utilizado ($P \leq 0.05$) (Cuadro 4). El aceite de *Jatropha curcas* presentó rendimientos mayores que el aceite de palma africana, contrario al rendimiento de glicerina que presentó valores más altos para el aceite de palma africana.

Cuadro 4. Efecto de los factores sobre el rendimiento del biodiesel.

Fuente de variación	Rendimiento de biodiesel		Rendimiento de glicerina		Porcentaje de ésteres monoalquílicos	
	F	P ¹	F	P	F	P
Aceite	9.19	0.02	18.89	0.01	281.59	0.01
Catalizador	2.24	0.17	2.70	0.13	27.43	0.01
Aceite × Catalizador	1.29	0.33	0.50	0.63	0.61	0.44
C.V. ² (%)	6.15		16.62		9.87	

¹Probabilidades significativas <0.05.

²C.V. = Coeficiente de variación.

Los rendimientos de biodiesel mostrados en el Cuadro 5 no sobrepasaron el 75% en los tratamientos que utilizaron NaOH como catalizador. Contrario a lo reportado por González (2012) que obtuvo rendimientos de 90.6% usando aceite de *Jatropha curcas* de la variedad Cabo Verde y utilizando NaOH como catalizador, sin embargo, este estudio se realizó con aceite desengomado y neutralizado; el aceite de *Jatropha curcas* del presente estudio solo tuvo un proceso previo de neutralizado. Kywe y Oo (2009) obtuvo rendimientos del 76% usando aceite de *Jatropha curcas* sin refinar, estos rendimientos fueron similares a los obtenidos en el presente estudio.

Cuadro 5. Rendimientos de aceite semi-refinado a biodiesel.

Catalizador	Fuente biodiesel	Rendimiento de Biodiesel	Rendimiento de Glicerina
		% \pm D.E. ¹	% \pm D.E.
NaOH	Jatropha	74.7 \pm 0.78 ^{abc}	20.1 \pm 2.78 ^{ab}
	Palma	72.6 \pm 0.27 ^c	25.0 \pm 0.63 ^a
Callera Trans L	Jatropha	83.4 \pm 0.23 ^a	14.0 \pm 0.03 ^c
	Palma	72.7 \pm 1.78 ^c	22.7 \pm 1.73 ^a
Novozym 435	Jatropha	82.8 \pm 0.54 ^{ab}	15.7 \pm 0.40 ^{bc}
	Palma	75.3 \pm 0.86 ^{abc}	22.6 \pm 0.73 ^a

¹ D.E. = Desviación Estándar.

^{abc} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

^x = Medidas seguidas de letras iguales en la misma columna indican igualdad estadística (P>0.05).

Para el aceite de palma africana se reportó rendimientos de 72.6% utilizando NaOH como catalizador, estos rendimientos fueron similares a los rendimientos reportados por Avellaneda Vargas (2010) que atribuyó los rendimientos bajos a la formación de jabones y geles por la presencia de AGL, que a pesar de ser despreciable (0.08%) interactúan con el catalizador (NaOH).

Para los tratamientos que utilizaron enzimas como catalizador no se observaron diferencias significativas usando aceite de *Jatropha curcas*, 83.4% y 82.8% para Callera Trans L y Novozym 435 respectivamente, estos rendimientos fueron superiores al control (NaOH), sin embargo, fueron iguales estadísticamente (P>0.05). De igual forma el biodiesel derivado de palma africana no presentó diferencias estadísticas en comparación al control (NaOH), los rendimientos del biodiesel de palma fueron de 72.7% y 75.3% para Callera Trans L y Novozym 435 respectivamente. Estos resultados fueron alentadores para el uso de catalizadores enzimáticos. Al utilizar aceites con bajo contenido de AGL no se explotó la principal ventaja del catalizador enzimático que es la no saponificación de los AGL, se estima que al usar aceites con altos contenidos de AGL los rendimientos de los tratamientos con catalizadores enzimáticos serán superiores a los rendimientos del biodiesel utilizando NaOH como catalizador.

Los rendimientos del biodiesel de *Jatropha curcas* utilizando Novozym 435 como catalizador fueron diferentes al rendimiento teórico (97.7%) reportado por Su *et al.* (2011). En este estudio se utilizó una metodología de superficie de respuestas (RSM) para la optimización de condiciones de producción de biodiesel de *Jatropha curcas* usando Novozym 435 como catalizador, sin embargo, el aceptor de acetilos utilizado fue dimetil carbonato (DMC) lo que pudo influir en los rendimientos por la inactivación enzimática que genera el metanol utilizado en el presente estudio como aceptor de acetilos (Azócar 2012), en el mismo estudio se reportó resultados de preliminares utilizando metanol que no entró en el proceso de optimización de condiciones debido a sus bajos rendimientos.

Tamalapundia *et al.* (2007), reportó rendimientos inferiores de biodiesel (75.1%) derivado de *Jatropha curcas* utilizando Novozym 435 como catalizador. Los rendimientos bajos los atribuyó a la alta cantidad de agua presente en el aceite de *Jatropha curcas* (3%) utilizado en este estudio.

Oliveira *et al.* (1999) reportó rendimientos similares a los de este estudio para el biodiesel de palma usando Novozym 435 como catalizador (77.4%), en este estudio se concluyó que la temperatura óptima fue de 45°C, razón por la cual los rendimientos pudieron haber sido ligeramente superiores a los encontrados en el presente estudio (T de reacción = 40°C).

Cesarinia *et al.* (2013), reportó rendimientos mayores en producción de biodiesel de aceite de soya utilizando Callera Trans L como catalizador, las condiciones utilizadas para la producción de biodiesel tuvieron una variación en la relación molar utilizada por el presente estudio, esta fue la razón principal por la cual pudieron haberse encontrado rendimientos menores.

El porcentaje de glicerina producto de la reacción es un indicativo de que la transesterificación de ácidos grasos al metanol es efectiva, el biodiesel de palma africana presentó porcentajes de glicerina mayores que el biodiesel de *Jatropha curcas*. El catalizador utilizado no afectó el porcentaje de glicerina a pesar de que los tratamientos enzimáticos no presentaron saponificación en comparación al control (NaOH) que sí presentó saponificación. Sin embargo, el hecho de que los aceites estuvieron dentro del parámetro establecido por la norma DIN V 51 605 para porcentaje de AGL causó que la saponificación en el tratamiento control sea despreciable (Gerpen 2005).

Uno de los principales errores al reportar rendimientos de biodiesel es asumir que todo el producto final son ésteres monoalquílicos (FAME) cuando puede existir un porcentaje de aceite que no ha sido transesterificado. En este estudio se estimó el porcentaje de transesterificación de los tratamientos que utilizaron enzimas usando como base el biodiesel con NaOH como catalizador (control), esta estimación no es exacta pues en el LAAZ no se cuenta con un estándar para biodiesel, los datos obtenidos indican que la reacción fue efectiva mas no el porcentaje de FAME producto de la reacción.

El catalizador y el tipo de aceite utilizado afectaron significativamente el porcentaje de FAME ($P < 0.05$), siendo el tipo de aceite el factor que tuvo mayor influencia en el porcentaje de FAME (Cuadro 4). La interacción aceite – catalizador no afectó significativamente el porcentaje de FAME ($P > 0.05$).

Cuadro 6. Porcentaje de ésteres monoalquílicos con respecto al control.

Catalizador	Fuente	Porcentaje de ésteres monoalquílicos
		% ± D.E. ¹
Callera Trans L	Jatropha	20.79 ± 2.05 ^d
	Palma	27.31 ± 1.25 ^c
Novozym 435	Jatropha	44.20 ± 5.07 ^b
	Palma	53.01 ± 3.24 ^a

¹D.E. = Desviación Estándar.

^{abcd} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

Los rendimientos en porcentaje de FAME con respecto al control mostrados en el Cuadro 6 no fueron superiores al 55% para ninguno de los tratamientos con catálisis enzimática. El tratamiento que obtuvo mayor porcentaje de FAME fue el biodiesel de Palma usando Novozym 435 como catalizador, seguido por el biodiesel de *Jatropha curcas* usando Novozym 435 como catalizador. Estos datos unidos a la presencia de glicerina en la separación de fases son indicativos de que la reacción de transesterificación fue efectiva.

A pesar de la subjetividad al tratamiento control (NaOH) que tiene este método, se pudo identificar que los tratamientos que usaron Novozym 435 presentaron una mayor conversión de FAME que los tratamientos que usaron Callera Trans L como catalizador, esta comparación concuerda con la comparación de los estudios de Su *et al.* (2011) y Cesarinia *et al.* (2013) que reportaron rendimientos de FAME superior para Novozym 435 (97.2 %) en comparación a Callera Trans L (95.6%).

Calidad de biodiesel. El cuadro 7 detalla los resultados para los parámetros más influyentes en la estabilidad oxidativa del biodiesel.

El aceite, el catalizador y la interacción entre el aceite y el catalizador afectaron significativamente ($P \leq 0.05$) la humedad del biodiesel. Se encontró que el tipo de aceite utilizado fue el factor que tuvo un efecto superior ($F = 176.67$, $P < 0.0001$) (Cuadro 7). Ninguno de los tratamientos cumplió con el parámetro establecido por la norma ASTM D6751 (0.05%).

Cuadro 7. Efecto de los factores en la estabilidad oxidativa del biodiesel.

Fuente de variación	Humedad		Porcentaje de AGL [£]		Índice de peróxidos		OSI [¥]	
	F	P ¹	F	P	F	P	F	P
Aceite	198.22	0.01	6255.57	0.01	12.09	0.01	176.67	0.01
Catalizador	358.48	0.01	37.36	0.01	71.85	0.01	94.97	0.01
Aceite × Catalizador	63.12	0.01	227.02	0.01	15.61	0.01	89.43	0.01
C.V. ² (%)	9.44		3.49		19.18		30.72	

¹ Probabilidades significativas <0.05.

² C.V. = Coeficiente de variación.

AGL[£] = Ácidos grasos libres.

OSI[¥] = Índice de estabilidad oxidativa (por sus siglas en inglés).

En el Cuadro 8 se puede observar que para los tratamientos que usaron catalizador alcalino (NaOH) mostraron los más bajos porcentajes de humedad, 0.11 % y 0.09 % para biodiesel de *Jatropha curcas* y palma africana respectivamente. Los datos de humedad para *Jatropha curcas* fueron similares a los porcentajes de humedad reportados por González (2012) para biodiesel de *Jatropha curcas* de la variedad Cabo Verde, el porcentaje de humedad para el biodiesel de palma africana fue menor en comparación al biodiesel de *Jatropha curcas*, esto se debió a que el aceite de palma africana presentó menores porcentajes de humedad. A pesar de que el aceite de *Jatropha curcas* y palma africana tuvieron contenidos de humedad iniciales menores el proceso de lavado incrementó la humedad en el biodiesel final.

Cuadro 8. Humedad y estabilidad oxidativa del biodiesel.

Catalizador	Fuente	Humedad	AGL [£]	Índice de peróxidos	OSI [¥]
		% ± D.E. ¹	% ± D.E.	meq/kg ± D.E.	h ± D.E.
NaOH	Jatropha	0.11 ± 0.01 ^d	0.10 ± 0.01 ^f	211.24 ± 13.63 ^a	3.90 ± 0.50 ^b
	Palma	0.09 ± 0.01 ^d	0.17 ± 0.01 ^e	90.89 ± 7.89 ^c	22.96 ± 2.37 ^a
Callera Trans L	Jatropha	0.30 ± 0.01 ^a	1.63 ± 0.03 ^a	144.77 ± 10.04 ^b	0.07 ± 0.02 ^c
	Palma	0.13 ± 0.01 ^c	1.28 ± 0.01 ^b	76.33 ± 5.26 ^c	0.48 ± 0.10 ^c
Novozym 435	Jatropha	0.29 ± 0.01 ^a	0.85 ± 0.05 ^d	115.29 ± 2.18 ^c	0.08 ± 0.01 ^c
	Palma	0.15 ± 0.03 ^b	0.96 ± 0.05 ^c	103.07 ± 4.09 ^c	0.06 ± 0.02 ^c

¹ D.E. = Desviación Estándar.

^{abcd} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

AGL[£] = Ácidos grasos libres.

OSI[¥] = Índice de estabilidad oxidativa.

Los tratamientos que utilizaron Callera Trans L como catalizador fueron los que presentaron mayores porcentajes de humedad, 0.30% y 0.13% para aceite de *Jatropha*

curcas y palma africana respectivamente. Esto se debió a que las condiciones de reacción para esta enzima requieren de un porcentaje de agua para activación de la misma (Cesarinia *et al.* 2013). La enzima Novozym 435 presentó porcentajes similares a los presentados con Callera Trans L.

El aceite, el catalizador y la interacción entre el aceite y el catalizador afectaron significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) del biodiesel. Se encontró que el tipo de aceite utilizado fue el factor que tuvo un efecto superior ($F = 6255.57$, $P < 0.0001$) (Cuadro 7). Solo los tratamientos que usaron NaOH como catalizador estuvieron por debajo de límite máximo permitido en la norma ASTM D6751 (0.25% de AGL máximo).

El porcentaje de AGL fue diferente para todos los tratamientos. Los tratamientos que utilizaron NaOH como catalizador fueron los únicos que cumplieron con el límite máximo establecido por la norma ASTM D6751 (0.25% máximo), estos resultados fueron similares a los obtenidos por González (2012) y Manzanares (2011). Los tratamientos con Callera Trans L fueron los que presentaron los mayores porcentajes de AGL tanto como para aceite de *Jatropha curcas* como para palma africana, seguidos por los tratamientos que utilizaron Novozym 435 como catalizador. La presencia de AGL en el biodiesel se debe a la poca capacidad de transesterificación del catalizador, que solo rompe el enlace éster que une el ácido al glicerol pero no los une al alcohol (Cruz 2011). Se pudo observar una relación inversa con el porcentaje de FAME reportado en el Cuadro 5, así se observa que a menor porcentaje de FAME mayor es el porcentaje de AGL.

El índice de peróxidos es un indicador de compuestos generados por la rancidez de los aceites o el biodiesel, la norma ASTM D6751 no especifica un parámetro para el valor de peróxidos, pues el índice de peróxidos no es un análisis muy adecuado para medir estabilidad oxidativa, tomando en cuenta que el índice de peróxidos es alto al iniciar la degradación oxidativa y a medida avanza el proceso de oxidación éste se reduce debido a la formación de compuestos secundarios (Dantas *et al.* 2011).

El aceite, el catalizador y la interacción entre el aceite y el catalizador afectaron significativamente ($P < 0.05$) el índice de peróxidos del biodiesel. Se encontró que el catalizador utilizado ($F = 71.85$, $P < 0.0001$) tuvo un efecto superior al aceite utilizado y a la interacción entre el aceite y el catalizador (Cuadro 7).

Los valores de índices de peróxidos mostrados en el Cuadro 8 fueron muy superiores a los reportados por González (2012), esto se debió principalmente a que el tiempo de secado del presente estudio fue de 24 horas a 105°C, tiempo mayor al usado por González (2012). La temperatura es uno de los principales causantes de la degradación oxidativa (Jain y Sharma 2011).

El índice de estabilidad oxidativa (OSI) es una prueba que usa condiciones de degradación oxidativa (temperatura y oxigenación) para determinar el tiempo al cual ocurre el mayor cambio en la tasa de oxidación del biodiesel, es decir la máxima segunda derivada de la conductibilidad eléctrica generada por los ácidos orgánicos volátiles, predominando el ácido fórmico, con respecto al tiempo. Los resultados de este análisis junto a los del valor

de índice de peróxidos dan una mejor idea de la estabilidad oxidativa del biodiesel analizado.

El aceite, el catalizador y la interacción entre el aceite y el catalizador afectaron significativamente ($P < 0.05$) el OSI del biodiesel (Cuadro 7). Se encontró que el factor que más influyó en el OSI fue el tipo de aceite utilizado ($F = 176.67$, $P < 0.0001$). Los resultados reportados solo presentaron diferencias estadísticas para los tratamientos en los que se usó NaOH como catalizador, siendo los únicos que superaron el límite mínimo establecido por la norma ASTM D6751 (3 h mínimo). El aceite de palma africana presentó mejor estabilidad oxidativa en comparación al aceite de *Jatropha curcas*, esto se debió a su mayor porcentaje de ácidos grasos saturados que por su doble enlace son más estables a la oxidación (Attanatho *et al. s.f.*; Jain y Sharma 2011).

El OSI del biodiesel de *Jatropha curcas* usando NaOH como catalizador fue de 3.90 h, González (2012) presentó resultados ligeramente inferiores para el biodiesel de *Jatropha curcas* de la variedad Cabo Verde. Por otro lado el biodiesel de palma africana usando NaOH como catalizador presentó valores de OSI superiores a 22 horas, valores similares a los presentados por Anguaya Velásquez (2007) que concluyó que el biodiesel que presentó mayor estabilidad para condiciones ambientales normales fue el de palma africana.

Los valores OSI para los tratamientos que utilizaron enzima como catalizador fueron menores a los que usaron NaOH como catalizador, ninguno presentó diferencias estadísticas entre tratamientos. Se puede observar que hay una relación inversa entre el porcentaje de AGL y el valor OSI, esto lo explicó Gerpen (2005) cuando determinó que los AGL son más susceptibles a la degradación oxidativa.

En cuanto a color, la luminosidad (L) se vio afectada por el catalizador y el tipo de aceite ($P < 0.05$), el factor que tuvo más influencia en L fue el tipo de aceite ($F = 432.43$, $P < 0.00$) (Cuadro 9), así se notó un color amarillo tenue en el biodiesel de palma africana y un color amarillo muy claro para el biodiesel de *Jatropha curcas*.

Cuadro 9. Efecto de los factores sobre los valores de L a y b del color del biodiesel.

Fuente de variación	L		A		b	
	F	P ¹	F	P	F	P
Aceite	432.43	0.01	173.95	0.01	678.87	0.01
Catalizador	345.49	0.01	108.91	0.01	3421.73	0.01
Aceite × Catalizador	0.78	0.47	7.56	0.01	172.25	0.01
C.V. ² (%)	0.61		5.78		2.96	

¹Probabilidades significativas < 0.05

²C.V. = Coeficiente de variación.

Los tratamientos que utilizaron NaOH como catalizador presentaron los valores más bajos para luminosidad (L) esto pudo deberse a la presencia de una pequeña cantidad de jabones producto de la reacción de los AGL con el catalizador básico (NaOH), para los

tratamientos que utilizaron enzimas como catalizador se observó una L más alta lo que significa que el biodiesel fue más claro.

Cuadro 10. Valor L para el color del biodiesel por cada fuente de biodiesel.

Catalizador	Color (Luminosidad)
	L ± D.E. ¹
NaOH	82.56 ± 1.76 ^b
Callera Trans L	88.16 ± 1.83 ^a
Novozym 435	87.96 ± 1.57 ^a

¹D.E. = Desviación Estándar.

^{abcd} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

El biodiesel de palma africana presentó menores valores de luminosidad en comparación al biodiesel de *Jatropha curcas*, esto se debió a la mayor presencia de ácidos grasos saturados en el biodiesel de palma africana que proveen un oscurecimiento del biodiesel (Anguaya Velásquez 2007).

Cuadro 11. Valor L para el color del biodiesel por cada catalizador.

Fuente de biodiesel	Color (Luminosidad)
	L ± D.E. ¹
Jatropha	87.86 ± 2.63 ^a
Palma	84.60 ± 2.65 ^b

¹D.E. = Desviación Estándar.

^{abcd} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

Los tratamientos que utilizaron aceite de *Jatropha curcas* como fuente de biodiesel fueron superiores a los tratamientos que utilizaron aceite de palma africana como fuente de biodiesel. Estos resultados fueron similares a los encontrados por González 2012 y Anguaya Velásquez 2007 para biodiesel de *Jatropha curcas* y palma africana respectivamente.

El biodiesel de *Jatropha curcas* presentó mayor valor de L debido a que la materia prima utilizada (aceite de *Jatropha curcas* y aceite de palma africana) presentó valores superiores de luminosidad para el aceite de *Jatropha curcas* en comparación al aceite de palma africana lo que se transmitió en el biodiesel resultante.

Cuadro 12. Valores a y b para el color del biodiesel.

Catalizador	Fuente	Valor a	Valor b
		a ± D.E.	b ± D.E.
NaOH	Jatropha	- 2.25 ± 0.17 ^a	10.58 ± 0.29 ^d
	Palma	- 3.36 ± 0.14 ^b	21.27 ± 0.10 ^a
Callera Trans L	Jatropha	- 4.10 ± 0.17 ^c	9.65 ± 0.30 ^e
	Palma	- 4.71 ± 0.12 ^d	16.61 ± 0.19 ^b
Novozym 435	Jatropha	- 3.59 ± 0.26 ^b	7.66 ± 0.50 ^f
	Palma	- 4.07 ± 0.25 ^c	12.58 ± 0.57 ^c

¹D.E. = Desviación Estándar.

^{abcd} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

El valor a en el biodiesel es prácticamente despreciable, el aceite, el catalizador utilizado y la interacción entre ellos afectaron significativamente este valor, siendo el tipo de aceite el factor que más influencia tuvo (F = 173.95, P < 0.0001), el valor a en todos los tratamientos solo llega hasta un -2.25 lo que indica la presencia de trazas verdes en el biodiesel, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Anguaya Velásquez (2007) y González (2012).

El valor b atribuye el color amarillo predominante en el biodiesel de aceites vegetales, se pudo observar diferencias estadísticas entre todos los tratamientos, siendo el catalizador el factor que más influyó en el valor b (F = 3421.73, P < 0.0001), en términos generales se pudo observar que todos los tratamientos derivados de palma africana presentaron mayor valor b, esto fue el resultado de la materia prima (aceite de palma africana) que tuvo un valor b mayor al de aceite de *Jatropha curcas*.

Cuadro 13. Efecto del catalizador sobre el perfil de ácidos grasos del biodiesel de *Jatropha curcas*.

Ácido graso	NaOH	Callera Trans L	Novozym 435
	% ± D.E. ¹	% ± D.E.	% ± D.E.
08:00	0.13 ± 0.03 ^x	0.05 ± 0.01 ^y	0.14 ± 0.01 ^x
14:00	0.10 ± 0.00 ^y	0.13 ± 0.00 ^x	0.13 ± 0.01 ^x
15:00	0.06 ± 0.01 ^y	0.24 ± 0.11 ^x	0.28 ± 0.00 ^x
16:00	14.97 ± 0.75 ^y	18.12 ± 0.26 ^x	18.24 ± 0.99 ^x
17:00	0.06 ± 0.00 ^y	0.98 ± 0.02 ^x	0.96 ± 0.07 ^x
18:00	7.63 ± 0.39 ^y	8.86 ± 0.12 ^x	8.77 ± 0.15 ^x
19:00	0.23 ± 0.02 ^y	0.26 ± 0.01 ^x	0.25 ± 0.02 ^{xy}
15:1 cis-10	0.23 ± 0.27 ^x	0.05 ± 0.00 ^x	0.04 ± 0.00 ^x
18:1n9c cis-9	41.62 ± 1.14 ^x	39.36 ± 0.40 ^y	40.18 ± 0.46 ^y
20:1 cis-11	0.16 ± 0.01 ^y	0.24 ± 0.03 ^x	0.20 ± 0.01 ^y
18:2n6 cis - 9,12	33.39 ± 2.09 ^x	30.91 ± 0.67 ^y	30.10 ± 0.89 ^y
22:5 cis - 7,10,13,16,19	0.00 ± 0.00 ^z	0.47 ± 0.06 ^y	0.63 ± 0.04 ^x
∑ Ac. Saturados	23.31 ± 1.08 ^y	28.63 ± 0.43 ^x	28.77 ± 1.14 ^x
∑ Ac. Monoinsaturados	42.24 ± 1.06 ^x	39.65 ± 0.38 ^y	40.42 ± 0.45 ^y
∑ Ac. Polinsaturados	33.51 ± 2.09 ^x	31.72 ± 0.71 ^{xy}	30.73 ± 0.87 ^y

¹D.E. = Desviación Estándar.

^{xyz} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas (P<0.05).

En el cuadro 13 y 14 se muestra el perfil de ácidos grasos del biodiesel de *Jatropha curcas* y palma africana respectivamente. Los resultados del biodiesel de *Jatropha curcas* concuerdan con los resultados reportados por González (2012) en los que predominan de acuerdo a su concentración en el biodiesel el ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1 n9 cis-9) y el ácido α -linoleico (18:2n6 cis-6,12). El cuadro muestra una mayor proporción de ácidos grasos saturados para los tratamientos que usaron enzima en comparación al control (NaOH), por lo que se concluye que en este experimento los tratamientos enzimáticos tuvieron una mayor afinidad para transesterificar los ácidos grasos saturados.

Cuadro 14. Efecto del catalizador sobre el perfil de ácidos grasos del biodiesel de palma africana

Ácido graso	NaOH	Callera Trans L	Novozym 435
	% ± D.E. ¹	% ± D.E.	% ± D.E.
08:00	0.03 ± 0.00 ^y	0.00 ± 0.00 ^z	0.04 ± 0.00 ^x
12:00	0.43 ± 0.00 ^z	0.82 ± 0.04 ^x	0.62 ± 0.06 ^y
14:00	0.84 ± 0.05 ^z	1.24 ± 0.02 ^x	1.09 ± 0.02 ^y
15:00	0.10 ± 0.00 ^y	0.00 ± 0.00 ^z	0.14 ± 0.00 ^x
16:00	40.60 ± 0.22 ^z	52.3 ± 0.24 ^x	49.82 ± 0.01 ^y
17:00	0.11 ± 0.00 ^y	0.13 ± 0.01 ^y	0.16 ± 0.00 ^x
18:00	4.86 ± 0.06 ^y	5.61 ± 0.05 ^x	5.63 ± 0.01 ^x
20:00	0.40 ± 0.00 ^z	0.49 ± 0.01 ^x	0.44 ± 0.00 ^y
16:1 cis-9	0.16 ± 0.00 ^y	0.19 ± 0.02 ^x	0.18 ± 0.01 ^{xy}
18:1n9c cis-9	42.40 ± 0.30 ^x	32.52 ± 0.27 ^z	34.93 ± 0.02 ^y
20:1 cis-11	0.06 ± 0.00 ^y	0.00 ± 0.00 ^z	0.30 ± 0.00 ^x
18:2n6 cis - 9,12	9.55 ± 0.09 ^x	6.37 ± 0.08 ^z	6.67 ± 0.01 ^y
18:3n3 cis - 9,12,15	0.31 ± 0.03 ^x	0.35 ± 0.04 ^x	0.31 ± 0.01 ^x
22:5 cis - 7,10,13,16,19	0.00 ± 0.00 ^z	0.47 ± 0.06 ^y	0.63 ± 0.04 ^x
∑ Ac. Saturados	47.44 ± 0.32 ^z	60.57 ± 0.33 ^y	57.92 ± 0.01 ^y
∑ Ac. Monoinsaturados	42.63 ± 0.30 ^x	32.71 ± 0.28 ^z	35.41 ± 0.02 ^y
∑ Ac. Polinsaturados	9.94 ± 0.08 ^x	6.72 ± 0.10 ^y	6.67 ± 0.01 ^y

¹D.E. = Desviación Estándar.

^{xyz} = Medidas seguidas de letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas (P<0.05).

Los resultados de biodiesel de palma africana concuerdan con los reportados por Avellaneda Vargas (2010) en los que predominan de acuerdo a su concentración en el biodiesel el ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1n9 cis-9) y el ácido linoleico (18:2n6 cis-9,12).

En la sumatoria de ácidos saturados, los tratamientos que utilizaron NaOH como catalizador presentaron los porcentajes más bajos de ácidos saturados, por otro los tratamientos que usaron enzimas no presentaron diferencias estadísticas entre sí en valores de porcentaje de ácidos saturados. En base a esto se puede concluir que las enzimas en este estudio tuvieron una mayor afinidad para transesterificar ácidos grasos saturados, esto se corrobora al revisar que los ácidos grasos insaturados presentaron diferencias estadísticas con valores menores para los tratamientos que utilizaron enzima en comparación a los tratamientos que utilizaron NaOH como catalizador.

4. CONCLUSIONES

- El biodiesel de *Jatropha curcas* producido con la enzima Callera Trans L presentó rendimientos estadísticamente iguales a Novozym 435 y al control (NaOH).
- El biodiesel de palma africana producido con la enzima Novozym 435 presentó rendimientos estadísticamente iguales a Callera Trans L y al control (NaOH).
- Ningún tratamiento que utilizó catalizador enzimático cumplió con los parámetros establecidos por la norma ASTM D6751. Los tratamientos que utilizaron NaOH como catalizador cumplieron con los parámetros solamente en AGL y OSI.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de optimización de condiciones para la enzima Callera Trans L.
- Hacer un estudio a escala de planta piloto o industrial usando enzimas como catalizadores de la reacción.
- Mejorar la cuantificación de FAME producidos por transesterificación incluyendo un estándar interno en el análisis cromatográfico.

6. LITERATURA CITADA

Al-Zuhair, S. 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 1(1):57-66.

American society for testing and materials. 2012 Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels. United States. Designation: D6751 – 11b.

Anguaya Velásquez, C.A. 2007. Estudio de estabilidad en almacén del biodiesel obtenido de aceite de soya (*Glycine max*), palma africana (*Elaeis guineensis*), maíz (*Zea mays*) higuerilla (*Ricinus communis*) y piñón (*Jatropha curcas*). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería de Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 71 p.

Attanatho, L., P. Thepkhun., A. Suemanotham., K. Perchtatim., Y. Thanmongkhon., P. Jenvanitpanjakul y Y. Yoshimura. s.f. Oxidation stability of biodiesel from tropical crops. Thailand Institute of Scientific and Technological Research Environment.

Avellaneda Vargas, F. 2010. Producción y caracterización de biodiesel de palma y de aceite reciclado mediante un proceso batch y un proceso continuo con reactor helicoidal. Tesis p.H.D. Tarragona, España, Universitat Rovira i Virgili. 202 p.

Azócar, L., G. Ciudad., R. Muñoz., D. Jeison., C. Toro y R. Navia. 2012. Feasible Novozym 435-Catalyzed Process to Fatty Acid Methyl Ester Production from Waste Frying Oil: Role of Lipase Inhibition (en línea). Consultado el 30 de septiembre de 2013. Disponible en www.intechopen.com.

Azócar, L.H. 2010. Proceso Enzimático Para La Producción De Metil Ésteres De Ácidos Grasos Utilizando Aceites Residuales De Fritura En Mezcla Con Aceite De Raps Como Materia Prima. Tesis Ph.D. Temuco, Universidad de la Frontera, Chile. 174p.

Azócar, L., G. Ciudad., H. J. Heipieper y R. Navia. 2010. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:621–636.

Bélafi-Bakó. K., Kovács., Gubicza., Hancsók. 2002. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system, biocatalysis and biotransformation. Taylor and Francis. 20(6).

Bermejo. M., E. Chel., A. Lozano., S. Félix y J. Martínez. s.f. Cuantificación de ésteres de forbol en semillas de *Jatropha curcas* L. silvestres y domesticadas, desarrolladas y

cultivadas en México. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, México. 4 p.

Blauensteiner, H., C. Schubl., T. Kaiser y S. Innerhofer. 2011. Demonstration of second generation vegetable oil fuels in advanced engines. Second edition. DIN V 51 605. 85 p.

Cesarinia, S., P. Diaza y P. M Nielsenb. 2013. Exploring a new, soluble lipase for FAMES Production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. *Process Biochemistry* 48: 484–487.

Chongkhong, S., C. Tongurai, P. Chetpattananondh y C. Bunyakan. 2007. Biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. *Biomass and Bioenergy* 31: 563–568.

Cruz Quiroz, B. A. 2011. Evaluación de estabilidad en almacenamiento en dos ambientes del biodiesel de aceite de palma africana (*Ealeis guineensis*) y dos variedades de piñón (*Jatropha curcas*). Proyecto especial de graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras. 26 p.

Dantas, M., A. Albuquerque., A. Barros y A. Souza. 2011. Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel. *Elsevier*. 90:773-778.

Espinal, A.F. 2012. Composición de la semilla y evaluación de la calidad del aceite y torta desgrasada de tres variedades de piñón (*Jatropha curcas*). Tesis Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 28p.

Fennema, O. 1993. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Fjerbaek, L., K.V. Christesen y B. Norddahl. 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*. 102: 1298-1315.

Gerpen, J.V. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology* 86: 1097–1107.

González, E.E. 2012. Caracterización fisicoquímica de biodiésel producido a partir de tres variedades de piñón (*Jatropha curcas*). Tesis Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 27p.

Goyal, P., M. P. Sharma y S. Jain. 2012. Optimization of conversion of high free fatty acid *Jatropha curcas* oil to biodiesel using response surface methodology. *International Scholarly Research Network*. 8 p.

Gunstone, F y F. Narris. 1983. Lipids in food chemistry, biochemistry and technology. Pergamon Press. Oxford.

Haas, W y M. Mittelbach. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial crops and products* 12: 111-118.

Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Roma. International Plant Genetic Resources Institute. 66 p.

Juan, J.C., D.A. Kartika, T.Y. Wu y T.Y. Hin. 2011. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. *Bioresource Technology* 102: 452–460.

Jain, S y M. P. Sharma, 2011. Oxidation and thermal behavior of *Jatropha curcas* biodiesel influenced by antioxidant and metal contaminants. *International Journal of Engineering*. 3:65-75.

Kumari, A., P. Mahapatra., V. K. Garlapati y R. Banerjee. 2009. Enzymatic transesterification of Jatropha oil (En línea). Consultado el 29 de septiembre del 2013. Disponible en <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/1>.

Kywe, T y M. Oo. 2009. Production of biodiesel from Jatropha oil (*Jatropha curcas*) in Pilot Plant. *World Academy of Science*.

Manzanares Paz, K.G. 2011. Predicción del número de cetano de biodiesel de piñón (*Jatropha curcas*) y palma africana (*Elaeis guineensis*) por cromatografía de gases. Proyecto especial de graduación de programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 27 p.

Mazariegos, D.E., K.J. Barrientos. 2012. Plan de negocios de una plantación de piñón (*Jatropha curcas*) y una planta extractora de aceite y transesterificación para producción de biodiesel en Guatemala. Tesis Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 18p.

Meher, L.C., D.V. Sagar y S.N. Naik. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 10: 248–268.

Mingorance, F., F. Minelli y H. Le Du. 2004. El cultivo de la palma africana en el Chocó. Colombia. *Human Rights Everywhere*. 180 p.

Mis Solval, K.E. 2008. Efecto del tiempo de freído del aceite de palma (*Elaeis guineensis*) sobre las características físico-químicas del biodiesel. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 30 p.

Modi, M.K., J.R.C. Reddy., B.V.S.K. Rao y R.B.N. Prasad. 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology* 98: 1260–1264.

Nakpong, P y S. Wootthikanokkhan. 2010. Optimization of biodiesel production from *Jatropha curcas*. L. oil via alkali-catalyzed methanolysis. *Journal of Sustainable Energy and Environment*. 1:105-109.

Oliveira, D y M. Alves. 1999. Enzymatic alcoholysis of palm and kernel oils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77-79.

Ranganathan, S.V., S.L. Narasimhan y K. Muthukumar. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology* 99: 3975–398.

Remmele, E y K. Thuneke. 2007. Pre-Standard Din V 51605 For Rapeseed Oil Fuel (En línea). Consultado el 1 de octubre de 2013. Disponible en www.beuth.de o www.din.de.

Robayo, C.M. 2005. Determinación del rendimiento de la reacción de transesterificación para la obtención de biodiesel a partir de oleína de palma y alcohol de caña, usando como catalizador la enzima Novozym 435. Tesis Ing. Agroindustrial., Bogotá, Colombia, Universidad de la Sabana. 75 p.

Ríos, L. A., A. Castrillon y E. Zuleta. 2009. Producción de biodiesel de aceite de palma con catalizadores básicos heterogéneos comparados con los homogéneos convencionales. *Energética Colombia*. 42:45-52.

Rose, D.J. y O. A. Pike. 2006. A Simple Method to Measure Lipase Activity in Wheat and Wheat Bran as an Estimation of Storage Quality. *JAOCS* 83: 415-419.

SAG (Secretaría de Agricultura y Ganadería de Honduras). 2013. Palma africana en Honduras. (En línea) Consultado el 8 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.ica.int/Esp/regiones/central/honduras/Documentospublicos/vc%20agrocadeas/Cadena%20Palma%20Africana%20-Honduras%202013.pdf>

Shimadaa, Y., Y. Watanabea, T. Samukawab, A. Sugiharaa, H. Nodac, H. Fukudab y Y. Tominagaa. 2009. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *JAOCS* 76: 789-793.

Su, E., L. Du., X. Gong y P. Wang. 2011. Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of *Jatropha Curcas* L. Seed Oil to Fatty Acid Esters: An Optimization Study. *J Am Oil Chem Soc* 88:793–800.

Tamalampudia, S., M.R. Talukdere, S. Hamad, T. Numatab, A. Kondob y H. Fukudaa. 2008. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal* 39: 185–189.

Wan, P. y P. Wakelyn. 1997. Technology and Solvent for extracting Oilseeds and non petroleum Oils. *American Oil Chemists Society*. 353 p.

Wink, M., C Grimm., C. Koschmieder., F. Sporer y O. Bergeot. 2000. Sequestration of phorbol esters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Chemoecology*. 10:179-184.

Zhang, B., Y. Weng, H. Xu y Z. Mao. 2012. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 93:61–70.

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis físico químico del aceite de *Jatropha curcas* utilizado para la elaboración del biodiesel.

Propiedades de estabilidad de las tres extracciones del aceite de *Jatropha curcas*.

Extracción	Humedad	AGL [£]	Índice de Peróxidos	OSI [¥]
	% ± D.E. ¹	% ± D.E.	meq/1000 ± D.E.	h ± D.E.
1	0.02 ± 0.00	0.17 ± 0.01	2.5 ± 0.5	8.90 ± 0.00
2	0.02 ± 0.00	0.15 ± 0.00	3.0 ± 0.0	8.18 ± 0.62
3	0.02 ± 0.00	0.15 ± 0.00	2.5 ± 0.5	9.16 ± 0.00

¹D.E. = Desviación Estándar.

AGL[£] = Ácidos grasos libres.

OSI[¥] = Índice de estabilidad oxidativa.

Color de las tres extracciones del aceite de *Jatropha curcas*.

Extracción	Color		
	L ± D.E. ¹	a ± D.E.	b ± D.E.
1	75.02 ± 0.14	-4.67 ± 0.06	16.08 ± 0.08
2	74.19 ± 0.01	-4.77 ± 0.02	16.23 ± 0.02
3	74.01 ± 0.11	-4.71 ± 0.06	16.20 ± 0.12

¹D.E. = Desviación Estándar.

Perfil de ácidos grasos para las tres extracciones de aceite de *Jatropha curcas*.

Ácido graso	Extracción 1	Extracción 2	Extracción 3
	% ± D.E. ¹	% ± D.E.	% ± D.E.
16:00	13.70 ± 0.00	13.72 ± 0.02	13.74 ± 0.05
17:00	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02
18:00	6.93 ± 0.02	6.92 ± 0.05	6.83 ± 0.10
20:00	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.05
16:1 cis-9	0.86 ± 0.00	0.85 ± 0.02	0.88 ± 0.04
18:1n9c cis-9	38.41 ± 0.08	38.41 ± 0.02	38.33 ± 0.03
18:1 cis-11	1.48 ± 0.00	1.50 ± 0.00	1.40 ± 0.10
18:2n6 cis - 9,12	38.27 ± 0.05	38.25 ± 0.07	38.48 ± 0.33
∑ Ac. Saturados	20.98 ± 0.02	20.99 ± 0.09	20.91 ± 0.22
∑ Ac. Monoinsaturados	40.75 ± 0.08	40.76 ± 0.01	40.62 ± 0.12
∑ Ac. Polinsaturados	38.27 ± 0.05	38.25 ± 0.07	38.48 ± 0.33

¹D.E. = Desviación Estándar.

Anexo 2. Análisis físico químico del aceite de palma africana utilizado para la elaboración de biodiesel.

Propiedades de estabilidad de las tres extracciones del aceite de palma africana.

Extracción	Humedad	AGL	Índice de Peróxidos	OSI
	% ± D.E. ¹	% ± D.E.	meq/1000 ± D.E.	h ± D.E.
1	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.0 ± 0.0	41.65 ± 0.52
2	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.0 ± 0.0	43.37 ± 0.85
3	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.0 ± 0.0	41.76 ± 1.09

¹D.E. = Desviación Estándar.

Color de las tres extracciones del aceite de palma africana.

Extracción	Color		
	L ± D.E. ¹	a ± D.E.	b ± D.E.
1	85.98 ± 0.09	-6.49 ± 0.08	28.24 ± 0.11
2	85.90 ± 0.12	-6.48 ± 0.11	28.35 ± 0.13
3	85.42 ± 0.54	-6.07 ± 0.48	27.88 ± 0.54

¹D.E. = Desviación Estándar.

Perfil de ácidos grasos para las tres extracciones de aceite de palma africana.

Ácido graso	Extracción 1	Extracción 2	Extracción 3
	% ± D.E. ¹	% ± D.E.	% ± D.E.
04:00	6.70 ± 0.22	8.26 ± 1.61	1.06 ± 0.23
12:00	0.71 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.71 ± 0.01
14:00	0.99 ± 0.02	0.90 ± 0.02	0.94 ± 0.01
16:00	36.85 ± 0.42	38.39 ± 1.15	40.84 ± 0.22
18:00	4.99 ± 0.02	4.41 ± 0.11	4.76 ± 0.08
16:1 cis-9	0.36 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.25 ± 0.06
18:1n9c cis-9	38.33 ± 1.03	38.96 ± 0.42	41.64 ± 0.07
18:2n6 cis - 9,12	10.09 ± 1.33	7.65 ± 0.48	9.17 ± 0.00
18:3n6 cis - 6,9,12	0.50 ± 0.06	0.41 ± 0.14	0.40 ± 0.00
20:4 cis - 5,8,11,14	0.45 ± 0.20	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.00
∑ Ac. Saturados	50.26 ± 0.58	52.59 ± 0.54	48.31 ± 0.12
∑ Ac. Monoinsaturados	38.69 ± 1.01	39.16 ± 0.22	41.90 ± 0.13
∑ Ac. Polinsaturados	11.05 ± 1.59	8.24 ± 0.32	9.79 ± 0.00

¹D.E. = Desviación Estándar

Anexo 3. Proceso ilustrado del proceso de producción de biodiesel con Callera Trans L como catalizador.

1. Preparación de la materia prima para la reacción: Se pesó el aceite en un Erlenmeyer, se pesó el metanol (relación molar 1.5 – 1), se pesó el porcentaje de agua destilada correspondiente (5% con respecto al peso del aceite) y finalmente se ubicó la enzima a utilizar en un vial (1% con respecto al peso del aceite) (Foto 1).

2. Reacción: Se calentó el aceite a 40 °C y se procuró que la temperatura no varíe. Luego se agregó la enzima previamente activada en agua (5% del peso del aceite) con una pipeta automática EPPENDORF.

Finalmente se agregó el metanol y se dejó reaccionar por 24 h a una agitación constante de 200 rpm (Foto 2).

3. Fin de la reacción: Pasadas las 24 horas se agregó 1/3 del peso del aceite con agua a 80°C manteniendo la agitación constante. Se pudo observar la precipitación de la glicerina al instante de colocar el agua (Foto 3), inmediatamente se ubicó el biodiesel en los tubos de ensayo para realizar la separación de fases (Foto 4) por centrifugación (2500 rpm por 20 min).

4. Lavados y secado del biodiesel: Después de haber separado las fases, se realizó dos lavados con 1/3 de agua con respecto al peso del biodiesel. La separación de fases en cada lavado se realizó por centrifugación (2500 rpm por 20 min).

5. Finalmente se secó el biodiesel a 105°C por 24 horas.



Foto 1. Dosis de enzima Callera Trans L



Foto 2. Método de reacción



Foto 3. Precipitación de glicerina



Foto 5. Biodiesel de Jatropha y palma (Callera Trans L)



Foto 4. Separación de fases

Anexo 4. Proceso ilustrado del proceso de producción de biodiesel con Novozym 435 como catalizador.

1. Preparación de la materia prima para la reacción: Se pesó el aceite en un Erlenmeyer, el metanol a utilizar (relación molar 3 -1) y finalmente la enzima Novozym 435 (Foto 1).
2. Reacción: Se calentó el aceite a 40 °C hasta que la temperatura se mantuvo constante. Se agregó la enzima con un embudo (Foto 2), y después se agregó el metanol. Se dejó reaccionar por 14 horas a una constante agitación de 200 rpm (Foto 3).
3. Fin de la reacción: Pasadas las 14 horas de reacción el biodiesel se filtró para recuperar la enzima Novozym 435 (Foto 4). El biodiesel filtrado se volvió a someter a agitación y se le agregó 1/3 del peso del biodiesel con agua a 80 °C. Inmediatamente se colocó el biodiesel en los tubos de ensayos para hacer la separación de fases por centrifugación (2500 rpm por 20 min).
4. Lavado y secado del biodiesel: Después de separar las fases, el biodiesel se sometió a dos lavados con 1/3 de agua con respecto al peso del biodiesel previamente calentada a 50°C. La separación de fases se realizó por centrifugación. Finalmente se secó el biodiesel a 105 °C por 24 horas. (Foto 5).



Foto 1. Novozym 435 nueva (izquierda), utilizada (derecha).



Foto 2. Agregación de enzima

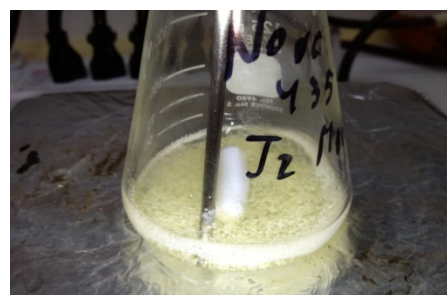


Foto 3. Reacción con la enzima.

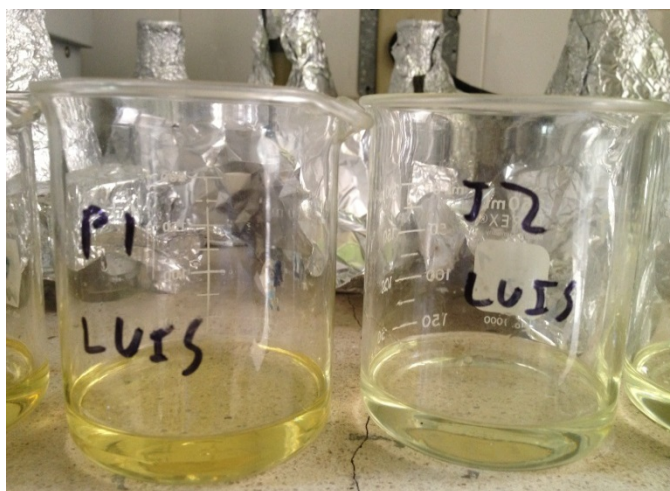


Foto 5. Biodiesel de palma y Jatropha (Novozym 435)



Foto 4. Filtrado del biodiesel.

Anexo 5. Proceso detallado para recuperación de enzima Novozym 435.

Se siguió el proceso descrito por Azócar 2010.

1. Al terminar la reacción el producto fue filtrado a un quitasato conectado a una bomba al vacío, bajo este filtro se obtuvo el biodiesel que siguió con el procedimiento detallado en el Anexo 4, por otro lado en la parte superior del filtro se obtuvo la enzima Novozym 435 que catalizó la reacción.
2. La enzima recuperada fue depositada en un matraz.
3. Se agregó una dosis de tert-butanol equivalente a 1/3 del peso de la enzima y se dejó interactuar con la enzima por 5 minutos.
4. Finalmente se agitó el matraz para favorecer la remoción del glicerol adherido a la enzima.
5. Se eliminó el tert-butanol residual. Este paso se repitió hasta que el tert-butanol residual fue transparente.
6. Finalmente se almacenó la enzima a temperatura de refrigeración hasta la próxima reacción.

