

**USO DE LIPASA INMOVILIZADA SOBRE MINERAL MAGNÉTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL A PARTIR DE ACEITE DE RICINO**



**LEYDI VIVIANA HERRERA A.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2013**

**USO DE LIPASA INMOVILIZADA SOBRE MINERAL MAGNÉTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE DE RICINO**

**LEYDI VIVIANA HERRERA A.**

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

Director:

**RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ, Ph.D.**

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)  
Departamento de Química  
Universidad del Cauca

Asesor:

**LUIS ALBERTO LENIS V, Ph.D.**

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)  
Departamento de Química  
Universidad del Cauca

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2013**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

Director de Trabajo de Grado \_\_\_\_\_  
**Ph.D. Ricardo Benítez.**

Jurado \_\_\_\_\_  
**Ph.D. Gloria I Benítez H.**

Jurado \_\_\_\_\_  
**Ph.D. Fabio A. Cabezas F.**

Popayán, 24 de abril de 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la sabiduría y sobre todo la fortaleza para iniciar y culminar esta carrera, por iluminarme en todo momento y recordarme siempre que los caminos difíciles de recorrer traerán consigo los más grandes frutos.

A mis padres y hermano por sus constantes esfuerzos, por brindarme su apoyo, confianza y sobre todo por inculcarme que con disciplina todo es posible de lograr.

A mi novio Juan C Galvis por su tratar de comprenderme cada día, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, por sus consejos, su confianza pero sobre todo por su amor, aliento que me ha dado fuerzas cuando más le he necesitado.

A mi director de trabajo de grado: Ph.D. Ricardo Benítez, por depositar su confianza en mí, por su paciencia, sus enseñanzas y su tiempo.

A todos los profesores del Departamento de Química por contribuir a mi formación académica y personal, especialmente a los del grupo de investigación, Química de Productos Naturales.

A mis amigos y compañeros de carrera por su comprensión, apoyo y confianza brindados y principalmente a Jeyson por haberme regalado tanto de su tiempo para escucharme aun cuando no vinera consejo alguno.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
2. OBJETIVOS .....	6
2.1 GENERALES .....	6
2.2 ESPECÍFICOS .....	6
3. MARCO TEÓRICO .....	7
3.1. HIGUERILLA ( <i>Ricinus communis</i> ) .....	7
3.1.1 ORIGEN DE LA HIGUERILLA .....	7
3.1.2 DESCRIPCIÓN GENERAL .....	7
3.1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	8
3.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....	8
3.1.5 VARIEDADES DE HIGUERILLA.....	11
3.1.6 MANEJO AGRONÓMICO.....	13
3.1.7 CICLO GERMINATIVO.....	14
3.1.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE RICINO .....	14
3.1.9 PRINCIPIOS TÓXICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN .....	15
3.1.10 PROPIEDADES DEL ACEITE DE RICINO .....	15
3.2 BIODIESEL .....	17
3.2.1 ENERGÍA RENOVABLE.....	17
3.2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BIODIESEL .....	17
3.2.3 VENTAJAS E INCONVENIENTES .....	18
3.2.4 TRANSESTERIFICACIÓN: PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	19
3.2.5 ESPECIFICACIONES PARA EL USO DEL BIODIESEL .....	21
3.3 ENZIMA ( <i>Lipasa</i> ) .....	23
3.3.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES ENZIMA .....	23
3.3.2 DEFINICIÓN: <i>Lipasa</i> .....	23
3.3.3 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPASAS .....	24
3.3.4 REACCIONES CATALIZADAS POR <i>Lipasas</i> .....	24
3.3.5 APLICACIONES DE LAS LIPASAS .....	27

<b>3.4 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA</b> .....	28
<b>3.4.1 GENERALIDADES</b> .....	28
<b>3.4.2 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN POR RETENCIÓN FÍSICA</b> .....	28
<b>3.4.3 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN POR UNIÓN QUÍMICA</b> .....	29
<b>3.4.4 DESCRIPCIÓN INMOVILIZACIÓN ENLACE COVALENTE</b> .....	30
<b>3.5 MATERIALES MAGNÉTICOS</b> .....	31
<b>3.5.1 GENERALIDADES</b> .....	31
<b>3.5.2 ÓXIDOS DE HIERRO COMO SOPORTE</b> .....	31
<b>3.5.3 OBTENCIÓN DE RESIDUOS AURIFEROS</b> .....	32
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	33
<b>4.1 OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA</b> .....	33
<b>4.2 ANÁLISIS DEL GRANO</b> .....	35
<b>4.2.1 ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO</b> .....	35
<b>4.2.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DEL GRANO</b> .....	36
<b>4.3 ANÁLISIS DEL ACEITE</b> .....	36
<b>4.3.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS</b> .....	36
<b>4.3.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS</b> .....	37
<b>4.4 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA</b> .....	38
<b>4.4.1 SÍNTESIS DE PARTICULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS (PMR) PARA USO COMO SOPORTE</b> .....	38
<b>4.4.2 ACTIVACIÓN DEL SOPORTE CON GLUTARALDEHÍDO</b> .....	39
<b>4.4.3 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA</b> .....	40
<b>4.4.4 CARACTERIZACIÓN</b> .....	40
<b>4.4.4.1 IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES</b> .....	40
<b>4.4.4.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (LOWRY)</b> .....	40
<b>4.5 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL</b> .....	41
<b>4.5.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	41
<b>4.5.2 TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE RICINO</b> .....	41
<b>4.5.3 ANÁLISIS DEL BIODIESEL</b> .....	42
<b>4.5.3.1 IDENTIFICACIÓN DE ÉSTERES</b> .....	42
<b>4.5.3.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS</b> .....	43

<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	44
<b>5.1 ANÁLISIS DEL GRANO</b> .....	44
<b>5.1.1 ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO</b> .....	44
<b>5.2 ANÁLISIS DEL ACEITE</b> .....	45
<b>5.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS</b> .....	45
<b>5.2.2 PROPIEDADES QUÍMICAS</b> .....	46
<b>5.2.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS</b> .....	47
<b>5.3 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA</b> .....	49
<b>5.3.1 RECUBRIMIENTO DEL SOPORTE MAGNÉTICO</b> .....	49
<b>5.3.2 ACTIVACIÓN DEL SOPORTE MAGNÉTICO</b> .....	51
<b>5.3.3 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA</b> .....	53
<b>5.3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO LOWRY</b> .....	54
<b>5.4 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL</b> .....	56
<b>5.4.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	56
<b>5.4.2 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE RICINO CON ETANOL</b> .....	60
<b>5.5 ANÁLISIS DEL BIODIESEL</b> .....	62
<b>5.5.1 IDENTIFICACIÓN DE ÉSTERES</b> .....	62
<b>5.5.2 CARACTERIZACIÓN DEL BIODIESEL POR ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR</b> .....	63
<b>5.5.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS</b> .....	67
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	74
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	75
<b>8. ANEXOS</b> .....	81

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>TABLA 1.</b> CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE HIGUERILLA .....	14
<b>TABLA 2.</b> CICLO GERMINATIVO DE LA PLANTA DE HIGUERILLA .....	14
<b>TABLA 3.</b> COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LA SEMILLA DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> .....	14
<b>TABLA 4.</b> COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE RICINO .....	16
<b>TABLA 5.</b> PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ACEITE DE RICINO .....	16
<b>TABLA 6.</b> ESPECIFICACIONES PARA EL USO DEL BIODIESEL.....	22
<b>TABLA 7.</b> ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO TRITURADO DE HIGUERILLA .....	35
<b>TABLA 8.</b> CONDICIONES DE REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASA LIBRE.....	42
<b>TABLA 9.</b> CONDICIONES DE REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASA INMOVILIZADA .....	42
<b>TABLA 10.</b> RESULTADOS ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO DE HIGUERILLA .....	44
<b>TABLA 11.</b> PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ACEITE EXTRAÍDO DE LAS SEMILLAS DE HIGUERILLA.....	47
<b>TABLA 12.</b> PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE RICINO .....	47
<b>TABLA 13.</b> RESULTADOS CURVA DE SEROALBÚMINA BOVINA REALIZADO POR TRIPLICADO .....	55
<b>TABLA 14.</b> RESULTADOS PROCESO DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	56
<b>TABLA 15.</b> RESULTADOS ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	52
<b>TABLA 16.</b> PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL BIODIESEL OBTENIDO .....	67
<b>TABLA 17.</b> RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA ENZIMALIPOZYME CALB LIBRE.....	82
<b>TABLA 18.</b> RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA ENZIMA LIPOZYME CALB INMOVILIZADA .....	82
<b>TABLA 19.</b> RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA ENZIMA LIPOZYME CALB INMOVILIZADA REUTILIZADA .....	83



## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>FIGURA 1.</b> CRECIMIENTO DE LA RAÍZ CENTRAL DE HIGUERILLA .....	9
<b>FIGURA 2.</b> TALLO DE PLANTA DE HIGUERILLA COLOR VIOLETA Y VERDE .....	9
<b>FIGURA 3.</b> HOJAS DE HIGUERILLA DE DIFERENTE TAMAÑO Y NÚMERO DE LÓBULOS.....	10
<b>FIGURA 4.</b> RACIMO DE FRUTOS DE PLANTA DE HIGUERILLA .....	11
<b>FIGURA 5.</b> SEMILLA DE PLANTA DE HIGUERILLA .....	11
<b>FIGURA 6.</b> SEMILLA DE HIGUERILLA USADA EN LA INVESTIGACIÓN .....	12
<b>FIGURA 7.</b> ESQUEMA Y REACCIÓN GENERAL DE TRANSESTERIFICACIÓN .....	20
<b>FIGURA 8.</b> REACCIÓN DE LIPASA HIDROLIZANDO UN TRIGLICÉRIDO.....	24
<b>FIGURA 9.</b> REACCIÓN DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR LIPASA.....	25
<b>FIGURA 10.</b> REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR LIPASA .....	25
<b>FIGURA 11.</b> REACCIÓN DE ALCOHÓLISIS CATALIZADA POR LIPASA .....	26
<b>FIGURA 12.</b> REACCIÓN DE ACIDÓLISIS CATALIZADA POR LIPASA.....	26
<b>FIGURA 13.</b> REACCIÓN DE INTERESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR LIPASA.....	26
<b>FIGURA 14.</b> CLASES DE INMOVILIZACIÓN QUÍMICA .....	30
<b>FIGURA 15.</b> SEMILLA DE HIGUERILLA EN PROCESO DE SECADO .....	33
<b>FIGURA 16.</b> SEMILLA DE HIGUERILLA SECA .....	34
<b>FIGURA 17.</b> SEMILLA DE HIGUERILLA SECA CON CASCARA.....	34
<b>FIGURA 18.</b> GRANO DE HIGUERILLA SIN CASCARA .....	34
<b>FIGURA 19.</b> GRANO BLANCO Y TRITURADO DE HIGUERILLA.....	34
<b>FIGURA 20.</b> DIAGRAMA DE FLUJO DEL ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO DE LA SEMILLA DE HIGUERILLA.....	35
<b>FIGURA 21.</b> PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE POR MEDIO DEL MÉTODO SOXHLET. MUESTRA DE ACEITE EXTRAÍDO. ....	36
<b>FIGURA 22.</b> PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (PM) .....	39
<b>FIGURA 23.</b> DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO DE SÍNTESIS DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS (PMR) .....	39
<b>FIGURA 24.</b> COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE RICINO, AGRUPADOS SEGÚN SU GRADO DE SATURACIÓN .....	47
<b>FIGURA 25.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO RICINOLÉICO .....	48
<b>FIGURA 26.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO LESQUERÓLICO .....	48
<b>FIGURA 27.</b> IMÁGENES PARTÍCULAS MAGNÉTICAS, PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS, RESPUESTA MAGNÉTICA DE LAS PMR.....	49
<b>FIGURA 28.</b> REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN, RECUBRIMIENTO DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (PM) .....	50
<b>FIGURA 29.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS.....	50

<b>FIGURA 30.</b> PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS Y ACTIVADAS (PMRA) Y SU RESPUESTA MAGNÉTICA .....	51
<b>FIGURA 31.</b> REACCIÓN DE ACTIVACIÓN DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	51
<b>FIGURA 32.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DE LAS PARTÍCULAS MAGNETICAS RECUBIERTAS Y ACTIVADAS .....	52
<b>FIGURA 33.</b> ESPECTRO FT-IR REPORTADO POR DUSSÁN DE LAS PARTÍCULAS MAGNETICAS RECUBIERTAS Y ACTIVADAS.....	52
<b>FIGURA 34.</b> ENZIMA INMOVILIZADA Y SU RESPUESTA MAGNÉTICA .....	53
<b>FIGURA 35.</b> REACCIÓN DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	53
<b>FIGURA 36.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) ENZIMA INMOVILIZADA.....	54
<b>FIGURA 37.</b> COMPLEJO COLOREADO FORMADO POR LA ACCIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN .....	55
<b>FIGURA 38.</b> CURVA PATRÓN DE SEROALBÚMINA BOVINA.....	56
<b>FIGURA 39.</b> PORCENTAJE DE TRIGLICERIDO TRASNESTERIFICADO POR UNIDAD DE TIEMPO PARA LA ENZIMA LIBRE.....	58
<b>FIGURA 40.</b> PORCENTAJE DE TRIGLICERIDO TRASNESTERIFICADO POR UNIDAD DE TIEMPO PARA LA ENZIMA INMOVILIZADA .....	59
<b>FIGURA 41.</b> PORCENTAJE DE TRIGLICERIDO TRASNESTERIFICADO POR UNIDAD DE TIEMPO PARA LA ENZIMAINMOVILIZADA REUTILIZADA.....	59
<b>FIGURA 42.</b> MECANISMO CATALÍTICO DE LA ENZIMA LIPASA SOBRE EL TRIGLICERIDO TRIRRICINOLEÍNA.....	61
<b>FIGURA 43.</b> REACCIÓN GENERAL DE LA PRUEBA DE HIDROXILAMINA .....	63
<b>FIGURA 44.</b> RESULTADO COLORIMÉTRICO DE LA PRUEBA DE HIDROXILAMINA PARA EL TRIPLICADO DEL EXPERIMENTO 4B. ....	63
<b>FIGURA 45.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DE ACEITE DE RICINO EXTRAÍDO .....	64
<b>FIGURA 46.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DEL BIODIESEL OBTENIDO DEL EXPERIMENTO 3A .....	65
<b>FIGURA 47.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DEL BIODIESEL OBTENIDO DEL EXPERIMENTO 3B .....	65
<b>FIGURA 48.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DEL BIODIESEL OBTENIDO DEL EXPERIMENTO 4A .....	66
<b>FIGURA 49.</b> ESPECTRO FT-IR (KBR) DEL BIODIESEL OBTENIDO DEL EXPERIMENTO 4B .....	66
<b>FIGURA 50.</b> ESTUFA EMPLEADA PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD .....	81
<b>FIGURA 51.</b> MUFLA EMPLEADA PARA LA DETERMINACIÓN DE CENIZAS.....	81
<b>FIGURA 52.</b> DIGESTIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA.....	81
<b>FIGURA 53.</b> DIGESTIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEINA POR EL MÈTODO DE KJELDAHL .....	81
<b>FIGURA 54.</b> EXTRACCIÓN DE LA GRASA DE LA MUESTRA EN EL EQUIPO SOXHLET .....	81
<b>FIGURA 55.</b> COLORACIÓN DEL INDICADOR DE TASHIRO EN SOLUCIÓN ÁCIDA.....	81

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL GRANO DE LA SEMILLA DE HIGUERILLA.....	81
<b>ANEXO B.</b> RESULTADOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	82

## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	Aceite
<b>Ac. C</b>	Aceite comercial
<b>Ac. Ext</b>	Aceite extraído
<b>APTS</b>	(3-(2-amino-etil-amino) propil) trimetoxisilano
<b>AOAC</b>	American Oil Chemist Society
<b>ASTM</b>	American Standard Testing Materials
<b>C 16:0</b>	Ácido palmítico
<b>C 18:0</b>	Ácido esteárico
<b>C 18:0 <i>Cis</i></b>	Ácido oleico
<b>C 18:1, OH</b>	Ácido ricinoléico
<b>C 18:2, n6 <i>Cis</i></b>	Ácido linoléico
<b>C 18:3, n3</b>	Ácido linolénico
<b>EN</b>	Norma europea
<b>ENN</b>	Extracto no nitrogenado
<b>Enz</b>	Enzima
<b>Enz-inm</b>	Enzima inmovilizada
<b>Exp</b>	Experimento
<b>EtOH: AC</b>	Relación Etanol: aceite
<b>Lip</b>	Lipasa
<b>PM</b>	Partículas magnéticas
<b>PMR</b>	Partículas magnéticas recubiertas
<b>PMRA</b>	Partículas magnéticas recubiertas activadas
<b>PMRA-ENZ</b>	Partículas magnéticas recubiertas activadas con enzima inmovilizada
<b>Solución A</b>	Mezcla de partículas magnéticas en agua destilada.
<b>Solución B</b>	Solución constituida por APTS, metanol y NaF
<b>Solución C</b>	Solución de tetraetilortosilicato
<b>Solución D</b>	Solución carbonato sódico al 2% en NaOH
<b>Solución E</b>	Sulfato cúprico al 1%
<b>Solución F</b>	Tartrato sódico-potásico al 2%
<b>TEOS</b>	Tetraetilortosilicato
<b>cSt</b>	Centiestokes

## RESUMEN

En la actualidad se buscan alternativas que puedan disminuir el uso del petróleo que es considerado como un recurso no renovable que tiende a agotarse. Esto ha permitido abrir paso a la investigación en la búsqueda de nuevos recursos que provengan de fuentes renovables y que a su vez su uso sea menos contaminante que los combustibles de orígenes fósiles. En un mundo globalizado y en proceso de integración productiva y energética que ha puesto la mirada en la obtención de alternativas energéticas renovables que acarren menos daños ambientales, es interesante estudiar las ventajas que tiene el uso de cultivos de plantas oleaginosas no comestibles con alto porcentaje de aceite de gran valor en el mercado internacional y que ofrece buenas perspectivas comerciales para su utilización en la producción de biocombustibles líquidos como el biodiesel.

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización química del aceite extraído de semilla de *Ricinus communis* debido a que este aceite es de gran interés para la industria de los biocombustibles. Según los resultados obtenidos la semilla de estudio presenta un buen contenido de aceite (54,44%), además de ser rico en grasas mono insaturadas y en menor cantidad constituido por grasas saturadas y grasas poli-insaturadas. De acuerdo con sus propiedades físicas y químicas evaluadas se destaca que el aceite de ricino cumple con los requerimientos básicos para su uso como materia prima para la producción del biocombustible.

El proceso de transformación del aceite mediante reacción de transesterificación fue llevado a cabo usando como catalizador lipasa (LIPOZYME CALB) libre y soportada sobre partículas magnéticas obtenidas de residuos auríferos; cada producto obtenido de los procesos realizados para lograr la inmovilización de la enzima fueron caracterizados mediante espectrofotometría FT-IR. En la reacción de transesterificación enzimática se comparó: la enzima lipasa libre e inmovilizada, condiciones de relación en peso 3:1 y 2:1 Etanol:aceite de ricino comercial o aceite extraído, carga enzimática de 0,05%, temperatura de reacción de 30 y 35°C y un porcentaje de agua del 10%. Al producto de cada reacción se le determinó los parámetros más importantes exigidos por la ASTM para evaluar la calidad del biodiesel, tales como, densidad, viscosidad, índice de refracción, índice de yodo, número de cetano, glicerina libre, glicerina total y destilación; estableciendo que el biodiesel de mejor calidad es el obtenido en las reacciones de transesterificación con enzima inmovilizada según los valores de densidad, viscosidad e índice de cetano, pero con una máxima conversión del aceite mediante la utilización de lipasa libre.

## INTRODUCCIÓN

Dada que la demanda energética de los países industrializados es satisfecha por medio del uso de combustibles fósiles derivados del petróleo, carbón y gas natural. El creciente consumo de energía, los problemas ambientales causados por el uso de combustibles fósiles, así como la acelerada disminución de sus reservas han creado la necesidad de investigar formas alternas de energía que sean técnicamente factibles, económicamente competitivas y ambientalmente amigables. Una posible alternativa es el uso de aceites de origen vegetal o grasa animal, materias primas que mediante tratamientos químicos se pueden convertir en biocombustibles, con propiedades energéticas similares a las del diesel derivado del petróleo. En nuestro país ya se ha iniciado el estudio de producción a gran escala de biodiesel a partir de aceites vegetales y grasas animales, en especial con aceites de palma e higuera. Pero hay que resaltar principalmente que no se busca un camino de competencia por suplir la necesidad energética sino la búsqueda alternativa de materias primas que por su alto contenido de aceite o grasa, ofrezcan la posibilidad de uso para transformarlo en un biocombustible sin generar ni crear una competencia frente a la seguridad alimentaria.

El presente trabajo propone el aceite de ricino o higuera como una posible fuente o materia prima para la producción de biodiesel, dado a que es posible su obtención de la semilla higuera, pues posee un alto contenido de este aceite que además de distinguirse entre otros aceites por su relativa densidad, viscosidad y que se disuelve completamente en alcohol, es no comestible hecho que se destaca al no ser una amenaza para la seguridad alimentaria.

El biodiesel al ser combustible renovable que se puede obtener principalmente a partir de aceites vegetales y grasas animales, así como de aceites reciclados, tiene una ventaja ecológica, en comparación con el diesel de origen fósil, ya que reduce las emisiones de gases que provocan el efecto de invernadero. Así, por ejemplo, el uso de una tonelada de Biodiesel, evita la producción de 2.5 toneladas de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y sobre todo elimina, si se usa el biodiesel sólo en los motores, las emisiones de azufre ( $\text{SO}_2$ ) del diesel, evitando las lluvias ácidas; además, lo que es fundamental: es un combustible renovable y no finito como los hidrocarburos.

Este trabajo pretende contribuir a las investigaciones realizadas en nuestro país en el área de los biocombustibles, además de aportar un camino de producción por vía enzimática libre e inmovilizada de la transformación química del aceite de higuera, producto que en nuestro país por ser netamente agrícola puede acarrear grandes beneficios económicos poniéndonos en los primeros lugares de producción de aceite de ricino destinado para la producción de biocombustibles.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sustitución de los combustibles denominados fósiles o tradicionales, derivados del petróleo, por otros, de origen vegetal, cobra una gran importancia en nuestros días por varias razones fundamentales, como el hecho de provenir de una fuente renovable, ser un instrumento de lucha contra el deterioro medioambiental, además de ser un factor de desarrollo de la agricultura e industrias derivadas [1].

El término Biodiesel se define como el éster mono-alquílico de cadena larga de ácidos grasos derivados de recursos renovables [2]. Los motores diesel de hoy requieren un combustible que sea limpio al momento de la combustión y además permanezca estable bajo las distintas condiciones en las que opera. El Biodiesel es el único combustible alternativo que puede usarse directamente en cualquier motor diesel, sin ser necesario ningún tipo de modificación y como sus propiedades son similares al combustible diesel de petróleo, se pueden mezclar ambos; siendo la mezcla más utilizada en nuestros días la correspondiente al 20%, es decir 20 partes de éster vegetal y 80 partes de petrodiesel, actualmente utilizada en Brasil. Cuando es utilizado como aditivo, sus concentraciones normalmente no superan el 5% [2]

Aunque muchos aceites de origen vegetal han sido estudiados para la producción de dicho combustible, una de las preocupaciones es el uso de fuentes renovables que directamente sean distribuidas para el consumo humano, por lo que se buscan nuevos aceites denominados como alternativos (no comestibles). En este caso citamos el aceite obtenido de semillas del arbusto de ***Ricinus communis***, aceite conocido bajo el nombre de *aceite de higuera o Castor* perteneciente al grupo de materias primas consideradas estratégicas para la producción de biodiesel en el país, de acuerdo con el proyecto de Transición de la Agricultura del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia [3]. Por tanto, dado la problemática frente a la seguridad agroalimentaria al disponer especies comestibles para fines energéticos es que actualmente se buscan fuentes renovables alternativas que no afecten el sector alimentario, en este caso la propuesta de obtener aceite a partir de la higuera puede convertirse en una opción para la producción de biocombustibles, ya que permite obtener un aceite no apto por sus propiedades químicas para el consumo humano, pero que si puede transformarse con fines energéticos, esto último siendo posible gracias a su composición química y estructural, como la presencia del grupo hidroxilo en el aceite, el cual le aporta unas propiedades especiales: solubilidad en alcoholes, viscosidad y gravedad específica relativamente altas. Por otro lado, respecto a la obtención de las semillas del arbusto ***Ricinus communis***, se presenta una gran ventaja, ya que al tratarse de un cultivo rústico que es adaptable a diferentes tipos de suelo, incluido los marginales y depredados por la actividad agrícola y cocalera, se considera este como un cultivo de fácil manejo, lo cual

evidenciaría los bajos costos durante la siembra y posterior cosecha de la fuente para su transformación de aceite a Biodiesel [4].

En cuanto al proceso químico que permite la transformación del aceite en una mezcla de ésteres alquílicos correspondientes al Biodiesel, se encuentra la transesterificación que se realiza mediante el uso de un catalizador; es en este punto donde cabe resaltar los diferentes tipos de catalizadores que permiten llevar a cabo tal proceso; dentro de ellos se encuentran los de tipo ácido como el ácido sulfónico y sulfúrico, aunque estos dan rendimientos muy altos de alquil ésteres presentan algunas desventajas como son altas temperaturas de reacción (55-80°C) respecto a otros catalizadores y tiempos de reacción muy elevados de hasta 50 horas para alcanzar la conversión completa de los reactantes, otra desventaja es que la reacción debe realizarse en ausencia de agua, ya que la presencia de esta, conlleva a la formación competitiva de ácidos carboxílicos, lo que reduce notablemente el rendimiento de alquil ésteres, aunque es claro que esta última es desventaja para cualquier tipo catalizador dadas las condiciones de reacción para la producción de biodiesel. Algo más y que es muy importante de resaltar con el uso de este tipo de catalizadores es su influencia directa en la proporción de azufre en el producto, hecho que disminuirá la calidad de este por su aporte de SO<sub>2</sub> al medio ambiente [5,6].

En el caso de los catalizadores básicos, que a diferencia del anterior, la transesterificación se realiza más rápidamente y su aplicación comercial es mayor debido a que son menos corrosivos que los anteriores, presentan una gran desventaja considerando la concentración de ácidos grasos libres presentes en el aceite puesto que estos interfieren en la reacción guiando a productos de saponificación [5]. Considerando ahora, las enzimas como biocatalizadores, se encuentran las lipasas. Algunas de las ventajas con las que cuenta este biocatalizador es la baja formación de co-productos, fácil separación de los productos cuando se encuentran inmovilizadas, condiciones de reacción moderadas con temperaturas entre 30-40°C y formación de ésteres de ácidos grasos como producto principal [5,7]. Como desventaja es importante resaltar que los catalizadores químicos exigen un tratamiento de aguas residuales, lo cual es sumamente significativo nombrar puesto que se desea obtener un biocombustible que no solamente sea amigable con el medio ambiente sino también lo sea en su proceso productivo. Por tanto es por esto que el uso de enzimas cuenta con la ventaja de menos gastos energéticos, la glicerina se puede recuperar fácilmente por decantación, además de que es un proceso amistoso ambientalmente y por tanto el tratamiento subsiguiente de aguas residuales no es necesario [6].

Por las razones expuestas, se destaca la importancia de estudiar la implementación del proceso productivo de Biodiesel partiendo de una especie no comestible (*Ricinus communis*) para la obtención del aceite, resaltando además que en Colombia está en ejecución un proyecto sobre "Evaluación de ambientes y materiales de higuerilla para la producción de aceite y biodiesel,"



dentro de la modalidad de investigación participativa, con grupos de agricultores de nuestro país [8], hecho que despierta un mayor interés por el estudio de esta planta oleaginosa como materia prima para la producción de un biocombustible que sea amigable con el medio ambiente como lo es el Biodiesel. Además de esto se resalta el uso del biocatalizador transesterificación lipasa, inmovilizada en soporte con propiedades magnéticas, que permitirá mayor manipulación del catalizador fomentando un proceso más viable al poder ser conducidas por medio de electroimanes en reactores industriales y con esto ubicarlas en las fases de mayor conversión de los triacilglicéridos a alquil esteres (biodiesel), obteniéndose un mayor ahorro de catalizador debido a que su acción se efectuaría en los sitios estratégicos y finalmente el poder ser recuperada la enzima gracias al proceso de inmovilización llevado a cabo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

Obtener biodiesel a partir de aceite no comestible extraído de semillas de *Ricinus communis* (Higuerilla), mediante el uso de la Lipasa (LIPOZYME CALB) inmovilizada en mineral magnético.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar las propiedades físicas (color, densidad, índice de refracción, viscosidad, punto de fluidez, punto de Fusión, punto de ebullición) y químicas (índice de yodo, índice de acidez, índice de saponificación, perfil de ácidos grasos) del aceite obtenido de la semilla del arbusto *Ricinus communis*.
- ❖ Implementar la inmovilización de la enzima LIPOZYME CALB sobre mineral Magnético, para su uso como catalizador en la reacción de transesterificación para la producción de esteres etílicos.
- ❖ Caracterizar estructuralmente la enzima inmovilizada a través del uso de espectrofotometría FTIR.
- ❖ Efectuar el proceso de transformación del aceite de higuerilla en biodiesel mediante la reacción de transesterificación con enzima Lipasa libre e inmovilizada.
- ❖ Comparar la actividad enzimática de la enzima libre vs la enzima inmovilizada.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos a partir de la identificación de las propiedades físicas y químicas tanto del aceite obtenido de la semilla de higuerilla como del biodiesel con estudios anteriores.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 HIGUERILLA (*Ricinus communis*)

##### 3.1.1 ORIGEN DE LA HIGUERILLA

El origen de la *Ricinus communis* L. está en Abisinia, Irán y Afganistán aparece como una planta ornamental en todas las regiones de la zona tropical o subtropical; de donde se extendió al Medio Oriente como planta silvestre. En la India y la China fue conocida hace unos 3000 años, probablemente se introdujo en América después del descubrimiento. Los egipcios hace más de 4000 años, empleaban la higuera en la iluminación o alumbrado de sus casas, parece que era una planta altamente estimada porque en algunas tumbas egipcias se encontraron sus semillas. El nombre aplicado a esta planta por Plinio y otros autores romanos, alude al parecido de sus semillas con la garrapata, llamada también *Ricinus* en latín. Pero el ricino era conocido desde mucho antes, pues lo nombran autores griegos como, Teofrasto y Dioscórides, con el nombre de Crotón [9].

##### 3.1.2 DESCRIPCION GENERAL

La higuera es una planta perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae y fácilmente se adapta diversos ambientes, en el mundo botánico es conocida, como *Ricinus communis*, cuyo nombre científico del Latín significa garrapata y hace referencia a la forma de la semilla; de ahí el nombre. La denominación <higuera del diablo> puede referirse al aspecto de sus hojas, como las de higuera, o a la coloración rojiza de los tallos, aunque también podría deberse a la toxicidad que encierran las semillas [9].

La higuera también es conocida con los nombres: Palma Cristi, Castor, Higuera infernal, Tártago, Higuera, Ricino; es un arbusto que crece silvestre en la mayor parte de las regiones tropicales desde el nivel del mar hasta los 3000 metros, la temperatura ideal para su cultivo esta en el rango de 20 a 30 °C, y no soporta heladas en cualquier etapa de su desarrollo. Es una planta heliófila, es decir; debe ser sembrada a plena exposición solar, cuando es sembrada a la sombra su crecimiento y producción es perjudicado sensiblemente., por esta razón, no es apropiada la siembra en sistemas agroforestales. La siembra en laderas de montañas o en áreas de relieve muy accidentado puede crear ambientes de poca insolación, los cuales no son apropiados para el cultivo del arbusto [10]. Una de las principales características de la higuera es su gran tolerancia a la sequía, esta condición permite su cultivo de forma económicamente viable en ambiente semiáridos donde hay pocas alternativas de uso agrícolas. Otro aspecto importante de destacar es su capacidad de absorción de anhídrido carbónico, por lo que reduce las acumulaciones de gas de

invernadero en la atmósfera. Se estima que el nivel de absorción de anhídrido carbónico de las plantas de ricino es de 34,6 toneladas por hectárea, con dos ciclos de cultivo por año [10].

Con respecto a su aceite no es considerado normalmente como comestible, sin embargo posee múltiples usos: Refinado tiene uso farmacéutico, en bruto se usa como emulsificante para desinfectantes del hogar, industria y pesticidas, modificado se emplea como aceite hidráulico, disolvente de pinturas, impregnación de tintura para textiles y cuero, fusión de ceras naturales y químicas así como en la fabricación de polímeros. La torta de higuerrilla no se utiliza como alimento animal debido a la presencia de toxinas y de sustancias alergénicas. Su empleo se limita especialmente en aplicaciones de fertilizantes orgánicos [11].

### 3.1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La planta objeto de trabajo fue clasificada por en el herbario de la Universidad del Valle por el Doctor Enrique Javier Peña Salamanca docente del departamento de botánica, concordando con el espécimen bajo el número de clasificación CUVC 37820 con la siguiente descripción taxonómica.

Reino:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión:	Spermatophyta (plantas con semillas)
División:	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase:	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase:	Rosidae
Orden:	Euphorbiales.
Familia:	Euphorbiaceae
Nombre científico:	<i>Ricinus communis</i> [11]

### 3.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El ricino es una planta herbácea en los países de clima templado, arborescente, y hasta de 8-10 m de altura en los intertropicales y subtropicales. En condiciones climáticas favorables, con un alto grado de humedad ambiental y calor adecuado (en el trópico), puede alcanzar varios metros de altura, así en estado silvestre es un árbol que alcanza los 10 metros de altura. Cultivado, en cambio, es un arbusto que apenas llega a los 4 m [11].

- ❖ **Raíz:** Es pivotante y puede alcanzar hasta 3 m de profundidad constituyendo la raíz principal de la planta. Presenta raíces secundarias numerosas y oblicuas que crecen a poca profundidad; en la figura 1 se muestra el nacimiento de una raíz de



**Figura 1. Crecimiento de la raíz central.**

Fuente: Proaño M. 2010 [9]

- ❖ **Tallo:** La planta está dotada de un tallo principal recto seccionado por los nudos en su parte inferior lo cual facilita la eliminación de la soca. Su color varía entre verde, rosado o caoba como se puede apreciar en la figura 2. El tallo principal termina en el primer racimo (inflorescencia), siendo este el primer nudo de la planta. A partir del cuarto nudo empiezan a aparecer las ramas secundarias y a su vez ramas adicionales observándose en ambas producciones de raíz

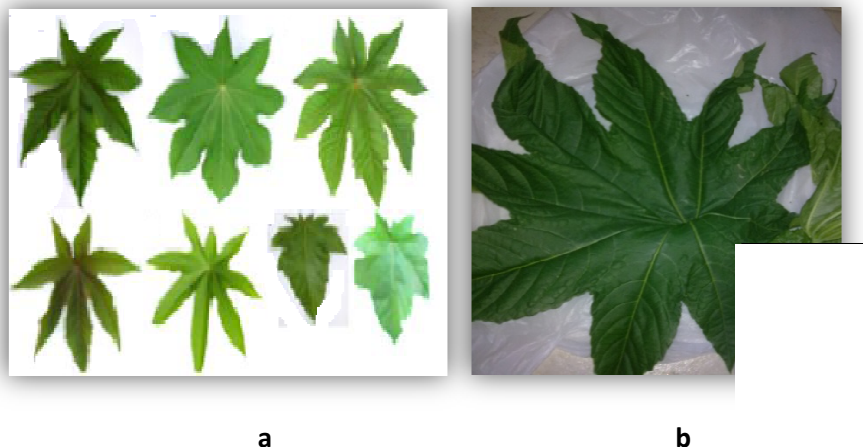


**Figura 2. Tallo de planta de Higuierilla color violeta y verde.**

Fuente: Proaño M. 2010 [9].

- ❖ **Hojas:** Alternas, pecioladas, palmeadas con 7 a 11 lóbulos, ver figura 3a; la presente investigación presenta 9 lóbulos como se puede apreciar en la figura 3b. Las hojas son dentadas, con nerviación palmatinervia. Pecíolos redondos de

de 10 a 20 cm de longitud; con dos glándulas nectaríferas en la unión de las glándulas en la unión con el pecíolo; la lamina de la hoja tiene 10 a 75 cm de color que va de verde a rojo [9,11].



**Figura 3. Hojas de Higuierilla de diferente tamaño y número de**

a) Fuente: Proaño M. 2010[9], b) Fuente: presente investigación

- ❖ **Flores:** El arbusto de higuierilla presenta diferentes tipos de expres tanto una planta monoica. Las flores están agrupadas en una panícula de 10 a 20 cm de largo, las flores femeninas están localizadas en la parte superior y las masculinas en la parte inferior de la inflorescencia. Las flores masculinas tienen 3 a 16 flores de pedicelo de 0.5 a 1.5 cm de largo, de 3 a 5 sépalos y pétalos ausentes, estambres numerosos de 5 a 10 mm con filamentos ramificados, cada filamento termina en una antera pequeña amarilla clara. Las flores femeninas en cimas de 1 a 7 flores, pedicelo de 3 a 5 sépalos de color verde de 3 a 5 mm de largo los cuales rodean un ovario superior con tres celdas, un óvulo por cada celda, la pared del fruto tiene espinas verdes y suaves, cada una termina en un punto transparente cuando el fruto se desarrolla, estilo muy corto que se divide en tres segmentos definidos de color rojo, suaves papilados y persistentes [9,11].
- ❖ **Frutos:** Es una cápsula globosa agrupada en tres lóculos de 1.5 a 2 cm de diámetro generalmente espinoso, ver figura 4. Los frutos inmaduros son generalmente verdes, algunas veces rojos, se vuelven cafés en la maduración, los estigmas del fruto en forma leñosa. La cápsula puede abrirse y soltar las semillas que pueden ser negras o jaspeadas [9,11].



a.

b.

**Figura 4. Racimo de Frutos de planta de Higuierilla**

a) Fuente: Chile flora [12], b) fuente: presente investigación

- ❖ **Semillas:** De forma oval aplastada, redondeadas en un extremo y en el otro una excrescencia llamada carúncula, de superficie brillante y lisa, de color gris con manchas rojizas y parduscas de tamaño variable que varían con el largo; la semilla tiene una cubierta dura y quebradiza exterior y otra interna de color blanquecino, ambas protegen la semilla, la cual consta de un embrión con sus dos cotiledones delgados y el albumen que es blando, como se muestra en la figura 5 se puede observar la secuencia de la semilla con sus diferentes partes tal como se describe, el albumen es el que contiene el aceite. La semilla contiene ricina (albúmica) y la ricenina (alcaloide) las cuales quedan en el residuo que sobra en la extracción del aceite [9,11].



**Figura 5. Semilla de planta de Higuierilla.**

Fuente: Higuierilla agroindustria [13].

### 3.1.5 VARIEDADES DE HIGUERILLA

- ***Ricinus communis mayor.***

Ricino grande. Es la más común, de hojas grandes de color verde, frutos numerosos, indehiscentes, su aceite es más indicado para uso industrial. Madura bien y es utilizada como planta ornamental [9], también es conocida con el nombre de higuierilla jaspeada ne...

- ***Ricinus communis minor.***

Ricino pequeño. De semillas pequeñas, es dehiscente, planta pequeña y muy ramificada desde la base [9].

- ***Ricinus communis sanguineus.***

Los tallos hojas y frutos son de color rojo intenso, semillas grandes de color pardo claro con manchas oscuras, en regiones frías se cultiva como ornamental [9].

- ***Ricinus communis viridis.***

Tallos y peciolo son de color verde claro, con tintes ligeramente rosados en los nudos, semillas pequeñas, grisáceas manchadas de pardo. Es tardía, se adapta a regiones templadas con lluvias [9].

- ***Ricinus communis inermis.***

Tallos, peciolo y hojas jóvenes de color rojizo, que se tornan verdes a la madurez. Los frutos no tienen espinas, semillas de color medio, de color castaño, porte pequeño, es precoz [9].

- ***Ricinus communis zanzibairiensis.***

Propia de climas tropicales, de tallos rojizos y hojas grandes, la fructificación es baja y tardía, semillas grandes, solo tiene valor como planta ornamental [9].

Sin embargo el Ricino se considera monotípico, es decir, de una sola especie. La amplia diversidad genética del Ricino se traduce en distintos tipos, que varían según diversas características: altura de planta, dehiscencia de los frutos, grado de ramificación, tamaño de la semilla y presencia o ausencia de espina. Las variedades de higuierilla, certificadas y reconocidas en Colombia son: la Higuierilla Blanca Jaspeada, la Higuierilla Negra, la Higuierilla Negra Jaspeada y la Higuierilla Roja, alguna de las cuales nacen de forma natural en nuestro país [8,9].

**Nota:** Para la realización de esta investigación se utilizó la Higuierilla ***Ricinus communis mayor o higuierilla negra jaspeada*** que se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Semilla de Higuierilla usada en la investigación**

Fuente: Higuierilla agroindustria [13]



### 3.2.6 MANEJO AGRONÓMICO

En el cultivo de Higuierilla, en todo el mundo, las condiciones climatológicas y de superficies son las mismas, por ello sus principales productores son países cuyos climas son más tropicales y de variaciones en el clima, tales como el caso de India, Brasil, China, y el propio Ecuador [9].

La especie (*Ricinus*) está adaptada a una amplia variedad de climas; crece en las zonas tropicales secas, tropicales húmedas y templadas. Está presente desde Ecuador hasta los 50º de latitud. Como planta típica de zonas cálidas, su producción es mayor cuando la media de las temperaturas mínimas se sitúa en torno a los 20ºC, y la media de las máximas alrededor de los 30ºC; si las temperaturas son inferiores a este rango, principalmente durante la floración, suele producirse una disminución en el número de flores femeninas. También la temperatura tiene mucha importancia en la etapa de la emergencia de la semilla, si la temperatura es menor de 20ºC la emergencia se tardará entre 15 a 20 días, y si la temperatura es mayor de 30ºC la emergencia será de 6 días. La planta es exigente a la alta luminosidad, requiriendo para completar su ciclo de 10 a 12 horas de luz solar diariamente. Puede producir con baja disponibilidad de agua, pero si dispone de ella, puede prolongar su período de fructificación [9].

Los cultivares de porte alto son los que mejor resisten los largos períodos de sequía, debido a que su sistema radicular tiene capacidad para alcanzar grandes profundidades. Los cultivares modernos, enanos y con raíces más superficiales, exigen precipitaciones, entre los 600 y los 1000 mm., que permiten obtener producciones de aproximadamente 5.000 Kg/ha [9,11].

En cuanto al suelo, La planta no tolera suelos ácidos, por lo que el pH debe mantenerse por lo menos en alrededor 6 a 7, que sería el pH óptimo para esta clase de cultivos, el mínimo tolerable para la planta es de 5.5. Cuando el pH está bajo 5, se puede aplicar cal para corregirlo, por lo menos tres meses antes de la siembra. Deben evitarse los suelos que se inundan con facilidad, pues no soporta el encharcamiento durante períodos prolongados. Las condiciones de suelos para este cultivo se establecen entre una mediana a alta fertilidad de suelos, profundos, sueltos, permeables, aireados, bien drenados, con altas cantidades de elementos nutritivos. Los suelos con pendientes sobre los 12% limitan el desarrollo del cultivo. Se trata de una planta muy exigente respecto a la fertilidad del suelo. Sin embargo, es un cultivo rústico adaptable a diferentes tipos de suelo, incluido los marginales y depredados por la actividad agrícola y cocalera [9]. En la tabla 1 se resumen las características expuestas que requiere el cultivo de Higuierilla.

**Tabla 1.** Características requeridas para el cultivo de Higuierilla [9]

<b>Altitud</b>	Costa, sierra y Amazonía, hasta los 300 metros sobre el nivel del mar
<b>Suelos</b>	De fertilidad media a alta; profundos, sueltos, permeables, aireados, bien drenados, con altas cantidades de nutritivos, con pH mayor a 5,5 (óptimo 6,0-7,0), no alcalinidad
<b>Precipitación</b>	200-4290mm anuales. Óptimo de 750-1000mm
<b>Temperaturas</b>	7-27,8°C Óptimo: 20-30°C
<b>Insectos dañinos</b>	Jogoto, Gusano Alambre, Gusano Soldado.

### 3.2.7 CICLO GERMINATIVO

La mayoría de variedades de higuierilla, tienen un ciclo germinativo prácticamente similar como el que se muestra en la tabla 2, características que influyen en el contenido de aceite que se puede obtener de la semilla [9,11].

**Tabla 2.** Ciclo germinativo de la planta de Higuierilla [9]

<b>ETAPAS</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Ciclo	150-250 días
Contenido de aceite en la semilla	45-55%
Productividad Media (baja)	1000 kg/ha (700 – 2000)
Rendimiento del aceite vegetal	470 kg/ha

### 3.2.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE RICINO

No existe información amplia en cuanto a los datos del análisis proximal de la semilla de higuierilla, de una manera general se muestran las concentraciones como se resume en la tabla 3, mostrando valores diferentes de acuerdo a la bibliografía consultada; la diferencia de estos puede deberse a la variedad de higuierilla que se haya usado en la investigación, así mismo como del ciclo germinativo de la planta, la altitud y demás condiciones físicas del cultivo de la higuierilla como las que se resumen en la tabla 2, por tanto se tienen rangos diferentes respecto al contenido de aceite y de sus demás componentes como proteína, contenido de ceniza, contenido de agua, carbohidratos, entre otros.

**Tabla 3.** Composición bromatológica de la semilla de *Ricinus communis*

<b>COMPONENTES</b>	<b>SEMILLA DE HIGUERILLA [14]</b>	<b>SEMILLA DE HIGUERILLA [15]</b>
Humedad (%)	3,70	4-8
Ceniza (%)	6,27	2-3
Proteína (%)	20	14-18
Grasa (%)	35-55	48-50
Carbohidratos o ENN (%)	----	5-10
Fibra (%)	----	15-18

### 3.2.9 PRINCIPIOS TÓXICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

La semilla contiene una fitotoxina proteica (*Ricina*) que actúa previniendo la síntesis proteica en los ribosomas. Esta considerada una de las toxinas vegetales más potentes, e incluso a dosis muy bajas puede causar la muerte. De hecho, la dosis mínima letal para muchos mamíferos por vía intravenosa es de 0.0001 mg/kg; sin embargo, por vía oral es menos tóxica, ya que no se absorbe bien. Por tanto, la toxicidad dependerá en gran medida de que la semilla haya sido masticada o simplemente tragada [16,17].

### 3.2.10 PROPIEDADES DEL ACEITE DE RICINO

El aceite de higuera, conocido comúnmente como aceite de ricino o de castor, se obtiene mediante la aplicación de presión y la extracción de solventes. La producción tanto de las semillas como del aceite se realiza actualmente en su mayor parte en India, Brasil y se consume sobre todo en Estados Unidos, Europa y Japón, principalmente para usos industriales. Es un aceite espeso, que entre los aceites vegetales se distingue por su alto contenido (más de un 85%) de ácido ricinoléico, con la peculiaridad de ser un ácido graso de 18 carbonos, con un doble enlace en los carbonos 9, 10 y un grupo hidroxilo en el carbono 12 [16,18].

Las características del aceite de ricino cumplen con la mayoría de los requisitos necesarios para que sea utilizado en la producción de biocombustibles alcanzando un buen rendimiento. Dentro de estos requisitos se encuentra principalmente: la solubilidad en alcoholes, la viscosidad que ofrecerá una mayor lubricidad al biodiesel, punto de inflamación elevado permitiendo un almacenamiento y transporte más seguro y un índice de yodo bajo disminuyendo la tendencia a la oxidación. Por lo anterior, es la sustancia más adecuada para producir biodiesel, porque es el único aceite vegetal soluble en alcohol y por lo tanto no se requiere la aplicación de calor y la consiguiente demanda de energía para transformarlo en combustible. El grupo hidroxilo en el aceite, le aporta unas propiedades especiales: solubilidad en alcoholes, viscosidad y gravedad específica relativamente altas. Además, compatibilidad con resinas y gomas naturales, aceites, ceras, resinas sintéticas y celulósicas, materiales en los cuales ejerce acción plastificante. Los grupos funcionales, hidroxilo, doble enlace y éster proveen sitios de reacción para la obtención de muchos derivados. El aceite que se extrae de las semillas de la *Ricinus communis* se emplea en motores de altas revoluciones, y este mismo aceite refinado se utiliza en la producción de cosméticos, aun en productos medicinales, especialmente para efectos purgativos o para aplicaciones de úlceras o brotes sobre la piel. El aceite sulfonado de higuera se conoce también por su utilidad en la impresión y acabado de tejidos de algodón, lino y seda. Este aceite en su estado de deshidratación sirve como base en la preparación de líquidos para frenos y pinturas. Cuando el aceite de ricino se disuelve en alcohol, es útil en la producción de lociones, perfumes; tiene su importancia además en la manufactura de plásticos y de nylon [9].

En la tabla 4 se observan diferentes reportes de la composición en ácidos grasos del aceite de ricino, donde las diferencias en los valores se deben según estudios reportados a las condiciones físicas del cultivo como la época, el periodo del ciclo germinativo y el tipo de semilla empleado [18]. En la tabla 5 se muestran las propiedades tanto físicas como químicas del aceite según los parámetros más importantes exigidos por la ASTM.

**Tabla 4.** Composición de ácidos grasos del aceite de Ricino

Ácido graso	Composición (%) [15,19]	Composición (%) [20]
<b>Grasas saturadas</b>		
Palmítico	0.9 – 1.2	2
Esteárico	0.7 – 1.2	1
dihidroxiesteárico	1.3 – 1.4	trazas
<b>Grasas mono insaturadas</b>		
Ricinoléico	89 – 89.4	87
Oléico	3.2 – 3.3	7
<b>Grasas Poli-insaturadas</b>		
Linoléico	3.4 – 3.7	3
Linolénico	0.2	No reportado

**Tabla 5.** Propiedades físicas y químicas del aceite de Ricino

Propiedad	Unidades	Estándar ASTM	Resultado	Valor típico
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	D-5	0.9707	0.96
Agua y sedimentos	%volumen	D-96	0.0	-
Corrosión	-	D-665	1A	-
Contenido de cenizas	%peso	D-482	0.015	<0.01
Residuo carbonoso	%peso	D-189	0.101	0.22
Punto de inflamación	°C	D-93	279.3	270
Punto de fluidez	°C	D-97	-2	-10
Viscosidad a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	D-445	266.81	297
Índice de acidez	mgKOH/g aceite	D-1980	2.1	-
Índice de saponificación	mgKOH/g aceite	D-5558	187.4	-
Índice de yodo	g yodo/100g aceite	D-5554	84.3	81-97

Fuente: Biodiesel de aceite de higuera como combustible alternativo para motores diesel. Benavides A., Benjumea P [21].

## **3.2 BIODIESEL**

### **3.2.1 ENERGÍA RENOVABLE**

Se denomina energía renovable a la energía que se obtiene de fuentes naturales inagotables, unas por la inmensa cantidad de energía que contienen, y otras porque son capaces de regenerarse por medios naturales [22].

De acuerdo a esto las energías renovables se clasifican en dos categorías: no contaminantes o limpias y contaminantes. Entre las primeras:

- El sol: energía solar
- El viento: Energía eólica
- Los ríos y corrientes de agua dulce: energía hidráulica
- Los mares y océanos: Energía mareomotriz
- El calor de la tierra: energía geotérmica
- Las olas: energía undimotriz

Las contaminantes (que son las realmente renovables, es decir, que se renuevan) se obtienen a partir de la materia orgánica o biomasa, y se pueden utilizar directamente como combustible (madera u otra materia vegetal sólida), bien convertida en bioetanol o biogás mediante procesos de fermentación orgánica o en biodiésel, mediante reacciones de transesterificación y de los residuos urbanos [22].

Las energías de fuentes renovables contaminantes tienen el mismo problema que la energía producida por combustibles fósiles: en la combustión emiten dióxido de carbono, gas de efecto invernadero, y a menudo son aún más contaminantes puesto que la combustión no es tan limpia, emitiendo hollines y otras partículas sólidas. Sin embargo se encuadran dentro de las energías renovables porque el dióxido de carbono emitido será utilizado por el siguiente ciclo de producción de materia orgánica en su proceso de fotosíntesis. También se puede obtener energía a partir de los residuos sólidos urbanos, que también son contaminantes [22].

### **3.2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BIODIESEL**

El biodiésel es un combustible sustituto del gasóleo para motores diesel, el cual puede ser producido partiendo de materias primas agrícolas (aceites vegetales y/o grasas animales). Posee las mismas propiedades del combustible diesel empleado como combustible para automóviles, camiones, ómnibus y puede ser mezclado en cualquier proporción con el diesel obtenido de la refinación del petróleo [11]; la ASTM (American Standards for Testing and Materials) lo define como “Ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables

tales como aceites vegetales y que se emplean en los motores de ignición de compresión (motores diesel) o en calderas de calefacción” [23].

A diferencia de otros combustibles, los biocarburantes o biocombustibles presentan la particularidad como se mencionó anteriormente de utilizar productos vegetales como materia prima, siendo las más utilizadas para su producción la colza, el girasol y la soja [22]. Este combustible puede utilizarse puro (B100, conocido como “gasoil verde”), o en mezclas de diferentes concentraciones con el diesel de petróleo. La mezcla más utilizada en nuestros días es al 20%, es decir 20 partes de éter vegetal y 80 partes de petrodiesel, actualmente utilizado en Brasil. Cuando es utilizado como aditivo, sus concentraciones normalmente no superan el 5%. Uno de los principales beneficios del biodiésel es su bajo contenido de azufre y que, debido a la presencia de oxígeno en su composición química, su combustión es más completa, reduciendo la emisión de partículas, monóxido de carbono e hidrocarburos no quemados, entre otros contaminantes [5].

### **3.2.3 VENTAJAS E INCONVENIENTES EN LA UTILIZACIÓN DE BIODIESEL**

El biodiésel, utilizado como combustible líquido, presenta ventajas energéticas, medioambientales y económicas. Los motores diesel de hoy requieren un combustible que sea limpio al quemarlo, además de permanecer estable bajo las distintas condiciones en las que opera. El biodiésel es el único combustible alternativo que puede usarse directamente en cualquier motor diesel, sin ser necesario ningún tipo de modificación. Como sus propiedades son similares al combustible diesel de petróleo, se pueden mezclar ambos en cualquier proporción, sin ningún tipo de problema [24].

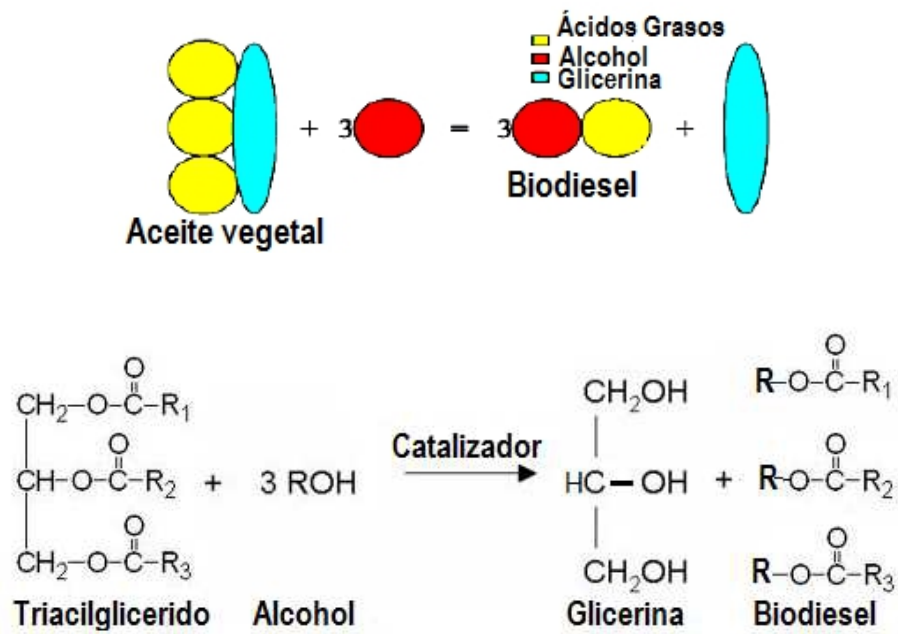
El biodiésel tiene unas propiedades físicas similares a las del gasóleo (densidad equivalente, viscosidad sólo ligeramente superior), sin embargo, como inconvenientes presenta un menor poder calorífico (alrededor de un 10%) y un comportamiento inferior a bajas temperaturas con tendencia al solidificarse en condiciones de frío extremas, lo que obliga a que deba ser tratado con aditivos específicos al igual que, por otra parte, se realiza con el propio gasóleo. Como ventajas cabe mencionar que presenta un número de cetano superior al del gasóleo, mejorándolo si se emplea como aditivo de éste y que presenta un punto de inflamación más alto, permitiendo un almacenamiento mucho más seguro [24].

- ***Ventajas de la utilización del biodiesel***
  - ✓ El biodiésel es un recurso renovable ya que se puede obtener de fuentes renovables así como de aceites reciclados; biodegradables y no tóxicos.
  - ✓ Es oxigenado, lo que hace que produzca menores emisiones de monóxido de carbono, de hidrocarburos no quemados y de partículas de humo, contribuyendo a la disminución de los gases de efecto invernadero.

- ✓ Puede ser usado directamente en motores de inyección directa, sin necesidad de adaptaciones especiales
  - ✓ Tiene mayor lubricidad y por tanto el desempeño de los motores registran diferencias significativas ya que alarga la vida del motor y reduce su ruido.
  - ✓ El manejo es más seguro, pues posee *flash point* (punto de inflamación) muy alto.
  - ✓ Los gases resultantes de la combustión no contienen SOx, principales causantes de la lluvia ácida.
  - ✓ Desarrollo local y regional: Mejora la cohesión económica y social y posibilita la creación de puestos de trabajo.
  - ✓ Puede contribuir a reducir la dependencia de combustible fósil del país.
  - ✓ Puede contribuir a la reducción de importaciones de diesel. [24,25]
- ***Inconvenientes en la utilización del biodiesel***
    - ✓ El biodiésel posee alrededor de 8% menos energía por litro que el diesel, viéndose afectada la potencia y aumentando el consumo del combustible.
    - ✓ Costos elevados de producción
    - ✓ Bajo los 0 °C pueden existir problemas de congelación del biodiésel y depósitos en el motor.
    - ✓ Aumento de las emisiones de aldehídos y de NOx debido al incremento de presión y temperatura en la cámara de combustión.
    - ✓ Al ser un buen solvente, puede disolver sedimentos presentes en el sistema de combustible del motor y causar obstrucción de filtros en su primer uso en motores que operan con diesel, por lo que se recomienda hacer una limpieza del sistema de combustible al cambiar de diesel a biodiésel.
    - ✓ El biodiésel se oxida con más rapidez que el diesel, característica que puede ser un problema para el almacenamiento a largo plazo para este producto. El biodiésel viejo se vuelve ácido y forma sedimentos saliendo de los estándares de calidad. Tiempo máximo de almacenamiento 21 días.
    - ✓ No es compatible con algunos tipos de materiales como plásticos, caucho, cobre (y sus aleaciones), plomo y zinc. [24,25]

#### **3.2.4 TRANSESTERIFICACIÓN: PROCESO QUIMICO DE PRODUCCION DE BODIESEL**

La transesterificación es el proceso de intercambiar el grupo alcoxi de un éster por otro alcohol. Cuando el éster original reacciona con un alcohol, el proceso de transesterificación es llamado alcoholísis. La transesterificación es una reacción de equilibrio que requiere un exceso de alcohol para favorecer la producción de alquilésteres [23].



**Figura 7.** Esquema y reacción General de Transesterificación [23].

Como se muestra en la figura 7 la reacción de moléculas de triglicéridos (el número de átomos de las cadenas está comprendido entre 15 y 23, siendo el más habitual de 18) se lleva a cabo con alcoholes de bajo peso molecular (metanol, etanol, propanol, butanol) para producir una mezcla de ésteres (biodiesel) y glicerina (que puede ser utilizada en cosmética, alimentación, farmacia, etc.). Dicha reacción, se desarrolla en una proporción molar de alcohol a triglicérido de 3 a 1, reaccionando en la metanólisis 1 mol de triglicérido con 3 moles de alcohol (aunque se añade una cantidad adicional de alcohol para desplazar la reacción hacia la formación del éster metílico). El triglicérido es el principal componente del aceite vegetal o la grasa animal. Además, la formación de la base de la glicerina, inmiscible con los ésteres metílicos, juega un papel importante en el desplazamiento de la reacción hacia la generación de productos, alcanzándose conversiones cercanas al 100% [24,26].

En la reacción de transesterificación se utiliza un catalizador para mejorar la velocidad de reacción y el rendimiento final. Los catalizadores pueden ser ácidos homogéneos ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{RSO}_3$ ), ácidos heterogéneos (Zeolitas, Resinas Sinfónicas,  $\text{SO}_4/\text{ZrO}_2$ ,  $\text{WO}_3/\text{ZrO}_2$ ), básicos heterogéneos ( $\text{MgO}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}/\text{NaOH}/\text{Al}_2\text{O}_3$ ), básicos homogéneos ( $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ) o enzimáticos (Lipasas: *Candida*, *Penicillium*, *Pseudomonas*). De todos ellos, los catalizadores que se suelen utilizar a escala comercial son los catalizadores homogéneos básicos ya que actúan mucho más rápido y además permiten operar en condiciones moderadas. En el caso de la reacción de transesterificación,



cuando se utiliza un catalizador ácido se requieren condiciones de temperaturas elevadas y tiempos de reacción largos, por ello es frecuente la utilización de derivados de ácidos más activos [24,26].

Se debe resaltar que existen unas variables que afectan la reacción de transesterificación, estas son:

- ✓ Calidad de las materias primas
- ✓ Temperatura
- ✓ Concentración del catalizador
- ✓ Relación molar alcohol/aceite
- ✓ Grado de agitación
- ✓ Humedad y ácidos grasos libres [23].

### **3.2.5 ESPECIFICACIONES PARA EL USO DEL BIODIESEL**

Se deben realizar una serie de ensayos para comprobar:

1. Calidad del combustible
2. Nivel de impurezas remanentes en el proceso de producción del Biodiesel.

Para ello existen diferentes normativas en el ámbito de países europeos (Austria, Francia, Italia,...) como el ámbito americano (ASTM y NBB) y europeo (EN). Las especificaciones propuestas por algunos de estos comités son las que se describen en la tabla 6 [27]. Se debe tener en cuenta que los estándares y especificaciones son técnicas establecidas en las normas de calidad existentes para el biodiésel que se basan en una amplia variedad de factores que varían entre las distintas regiones. Entre estos factores se incluyen los estándares existentes para el diesel convencional, los tipos de motores diesel más comunes en la región y los límites establecidos por la regulación sectorial sobre la protección del medio ambiente y las emisiones en el sector del transporte. Aunque existen numerosas normas de calidad para el biodiésel, la mayor parte de ellas se basan en la norma europea EN 14214 y la estadounidense A.S.T.M D 6751 [28].

Las diferencias entre ellas no sólo incluyen los estándares de calidad considerados y los valores límite aplicados a cada uno de ellos, sino que también a los métodos de medida, que aunque en muchos casos se tratan técnicas similares, emplean procedimientos distintos que implican una difícil comparación entre los valores límite de los estándares. Otra diferencia esencial entre las especificaciones técnicas europeas y norteamericana es que las norma A.S.T.M se aplica tanto a los ésteres metílicos como a los ésteres etílicos de ácidos grasos, mientras que la norma EN solo es de aplicación para los primeros. Asimismo, la norma estadounidense establece las especificaciones técnicas para el componente biodiésel (B100) mezclado con diesel convencional mientras que la europea lo hace tanto para el combustible resultado de mezclar biodiésel con diesel convencional como para el componente puro B100 que compone la mezcla [28].

**Tabla 6.** Especificaciones para el uso del Biodiesel [27]

Parámetro	Norma	Unidades	ASTM PS 121:99	Limite CEN/TC 19	Limite NBB
Densidad (15°C)	ASTM D 1298 EN ISO 12185	g/cm <sup>3</sup>	0.860-0.900	0.860-0.900	
Viscosidad cinemática 40°C	ASTM D 445 EN ISO 3104	cSt	1.9-6.0	3.5-5.0	1.9-6.0
Punto inflamación	ASTM D 93 ISO/CD 3679	°C	100min	101min	130min
POFF	IP 309	°C	usuario	usuario	usuario
Punto de nube	ASTM D 2500	°C	usuario	usuario	usuario
Azufre	ASTM D 5453 EN ISO 14596	%	0.05 máx.	10ppm máx.	0.05máx.
Residuo carbonoso	ASTM D 4530 EN ISO 10370	%	0.050máx.	0.3 máx.	0.050máx.
Agua y sedimentos	ASTM D 2709	%	0.050máx.		0.050máx.
Estabilidad de oxidación	PrEN 14112	horas		Min 6	
Destilación 90%	ASTM D 86	°C	345 máx.		360 máx.
Agua	ASTM D 1533 EN ISO 12937			500 máx.	
Contaminación total	EN 12662	mg/Kg		24 máx.	
Corrosión al cobre	ASTM D 130 EN ISO 2160		N°3 máx.	Clase 1	N°3 máx.
Cenizas sulfatadas	ASTM D 874 ISO 3987	%	0.02 máx.	0.02 máx.	0.02 máx.
TAN	ASTM D 664 prEN 14104	mgKOH/g	0.80 máx.	0.50 máx.	0.80 máx.
Metanol	prEN 14110	% (m/m)	0.2 máx.	0.2 máx.	
Monoglicéridos	prEN 14105	% (m/m)	0.8 máx.	0.8 máx.	
Diglicéridos	prEN 14105	% (m/m)	0.2 máx.	0.2 máx.	
Triglicéridos	prEN 14105	% (m/m)	0.2 máx.	0.2 máx.	
Glicerina libre	ASTM D 6584 prEN 14105-06	% (m/m)	0.020 máx.	0.02 máx.	0.02 máx.
Glicerina total	ASTM D 6584 prEN 14105	% (m/m)	0.240 máx.	0.250 máx.	0.240 máx.
Contenido de éster	prEN 14103	% (m/m)		96.5min	
Ester metílico del	prEN 14103	% (m/m)		12 máx.	

ác. linoléico					
Esteres metílicos		% (m/m)		1 máx.	
Índice de yodo	prEN 14111		110 máx.	120 máx.	
Fosforo	ASTM D 4951 prEN 14107	mg/Kg		10 máx.	10 máx.
Sodio + potasio	prEN 14108-09	mg/Kg		5 máx.	
Numero de cetano	ASTM D 613 EN ISO 5165		40min	51min	47min

### 3.3 ENZIMA: *Lipasa*

#### 3.3.1 DEFINICIÓN Y CARACTERISTICAS GENERALES ENZIMA

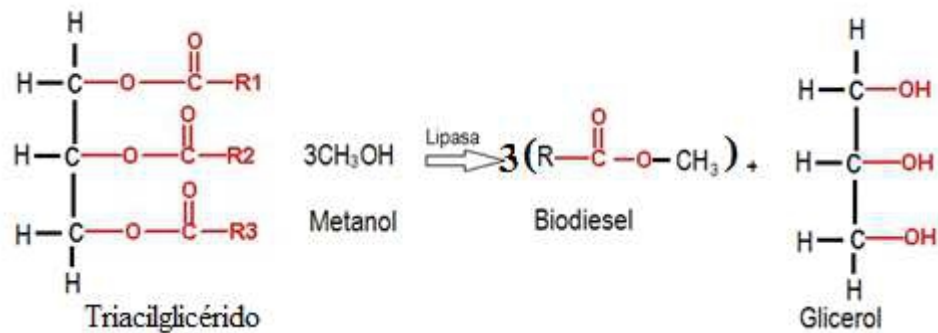
Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas siempre que sea termodinámicamente posible, por lo cual se les denomina biocatalizadores. Como todos los catalizadores, funcionan disminuyendo la energía de activación para una reacción, acelerándose sustancialmente la velocidad de reacción. Las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas, siendo su actividad afectada por agentes ambientales como la temperatura, el pH, la presión y/o agentes operacionales como la aireación [29].

En los últimos años, la utilización de biocatalizadores ha aumentado considerablemente al presentar importantes ventajas respecto a los procesos químicos convencionales. Son selectivas y específicas, presentan condiciones de trabajo de fácil manejo, evitan la formación de productos secundarios típicos de procesos químicos, consiguiendo la reducción de pasos de purificación del producto deseado y la recuperación del biocatalizador, y generan menos residuos, por ejemplo no suelen necesitar cantidades importantes de solventes orgánicos [29]. Sin embargo a pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no es posible su reutilización, aunque con la inmovilización se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable [30].

#### 3.3.2 DEFINICIÓN *Lipasa*

De acuerdo con la definición de la comisión de enzimas de la IUPAC las lipasas son triacilglicerol éster hidrolasas, es decir, enzimas que catalizan de forma natural la hidrólisis de triacilglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como mono y diglicéridos. En caso de ser utilizadas en presencia de un alcohol de cadena corta son capaces de llevar a cabo procesos de transesterificación como se muestra en la figura 8 formando productos como el glicerol y ésteres etílicos o metílicos según sea el alcohol que se

utilice. Están presentes en la totalidad de los organismos vivos, desde los microorganismos hasta los animales superiores, siendo imprescindibles para la asimilación de los lípidos así como también para el almacenamiento y posterior utilización de las grasas que sirven de reserva energética [30].



**Figura 8.** Reacción de las lipasas hidrolizando un triglicérido, en donde R son cadenas carbonadas.

### 3.3.3 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPASAS

La especificidad de las lipasas está directamente relacionada con el microorganismo productor de las mismas. De acuerdo con esto, existen lipasas No específicas, es decir, aquellas que hidrolizan el triglicérido en cualquiera de sus posiciones, obteniéndose como productos intermedios (1,2) (2,3) (1,3) diglicéridos y monoglicéridos. A este grupo pertenece la lipasa de *Candida rugosa* y la *Candida curvata*. Por lo que se refiere a lipasas específicas dicha especificidad puede ser de dos tipos:

1. **Posicional:** cuando se hidrolizan preferentemente ciertas posiciones del triglicérido, normalmente las posiciones 1 y 3 que son las más accesibles. Pertenecen a este tipo de lipasas las producidas por *Yarrowia lipolytica*, *Candida deformans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus* y *Rhizopus delemar*.
2. **De ácido Graso:** cuando se cataliza la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular de un triglicérido. Ejemplos de este tipo son las lipasa de *Penicilium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* y *Geotrichum candidum* [29].

### 3.3.4 REACCIONES CATALIZADAS POR Lipasas

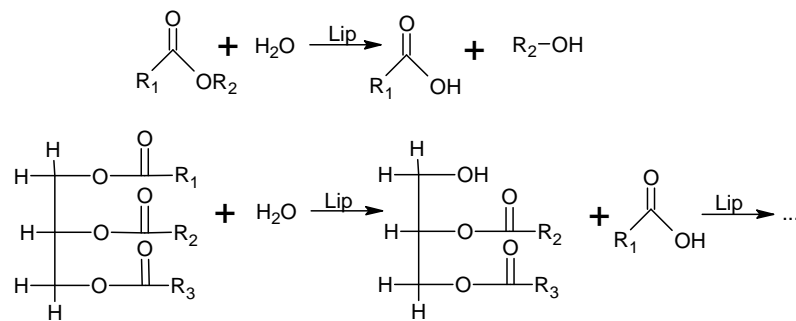
Como corresponde a su función biológica las lipasas catalizan de forma natural la hidrólisis de ésteres, especialmente triacilglicéridos de cadena larga, para dar monoacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol. Sin embargo son también capaces de catalizar la reacción inversa, es decir esterificación y transesterificación, en ambientes microacuosos. El equilibrio entre la reacción directa (hidrólisis) y la inversa (síntesis) está determinado por la

actividad del agua en el medio de reacción. La reacción de transesterificación puede a su vez clasificarse en alcoholólisis, acidólisis e intersesterificación, en función de que tenga lugar entre un éster y un alcohol, un éster y un ácido carboxílico o dos ésteres respectivamente [31].

La capacidad de las lipasas para actuar de forma selectiva sobre diferentes sustratos viene determinada por las propiedades de la enzima a nivel molecular, la estructura del sustrato y en definitiva por los factores que afecten a la unión enzima-sustrato. A su vez la especificidad de estos biocatalizadores está directamente relacionada con el microorganismo productor de las mismas [31].

- **Reacción de Hidrolisis**

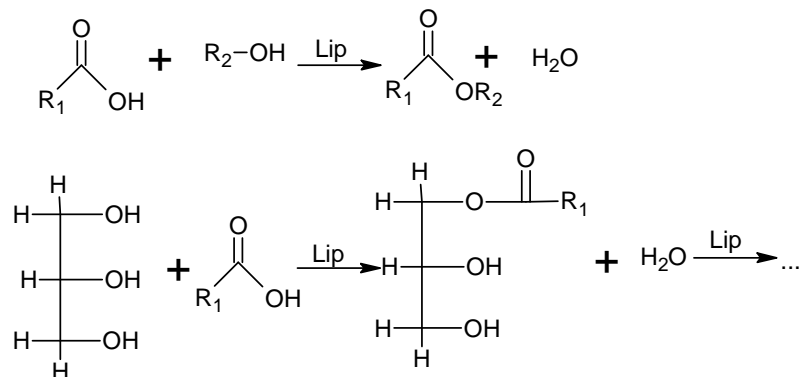
Es la descomposición de un éster en su ácido y alcohol constituyente en presencia de agua tal como se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Reacción de hidrolisis catalizada por lipasa [31].

- **Reacción de Esterificación**

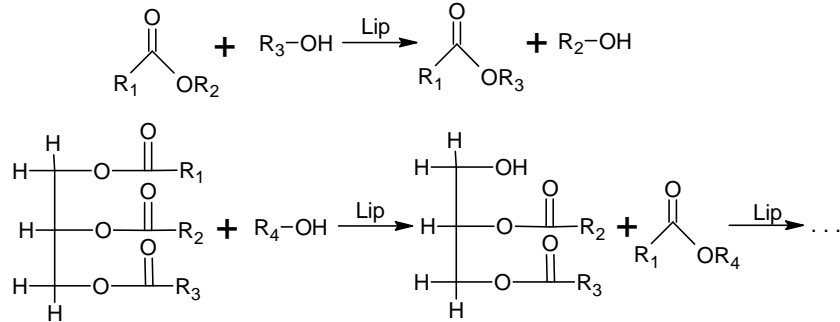
En la figura 10 se muestra la reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol para dar un éster, llamada reacción de esterificación.



**Figura 10.** Reacción de esterificación catalizada por lipasa [31].

- **Reacción de Alcohólisis**

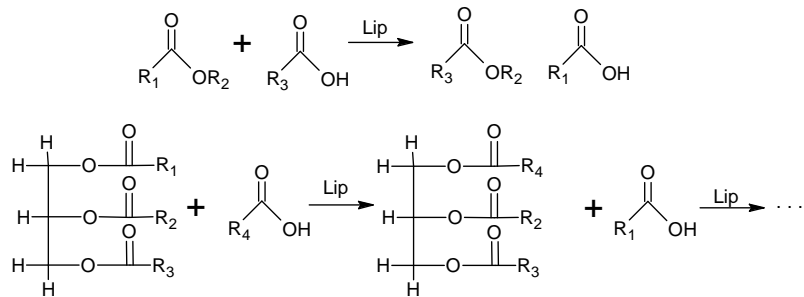
Es la reacción entre un éster y un alcohol produciéndose la sustitución de un grupo alquilo del éster por otro, ver figura 11. Esta reacción es la utilizada en el presente trabajo de investigación, también conocida con el nombre de transesterificación.



**Figura 11.** Reacción de alcohólisis catalizada por lipasa [31].

- **Reacción de Acidólisis**

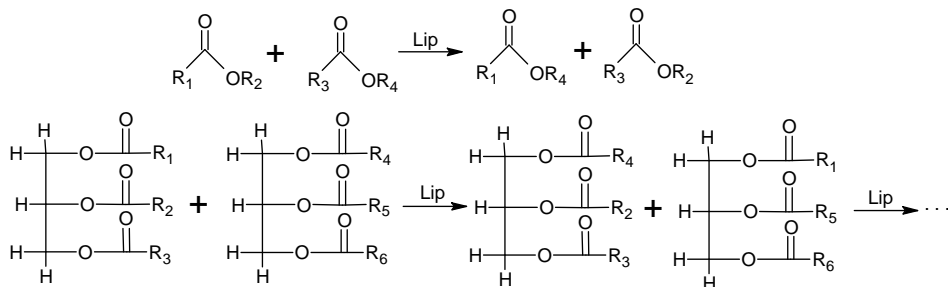
Es la reacción entre un éster y un ácido carboxílico como se puede observar en la figura 12, que transcurre con el reemplazo del grupo acilo del éster por el del ácido libre.



**Figura 12.** Reacción de acidólisis catalizada por lipasa [31].

- **Reacción de interesterificación**

Es la reacción entre dos ésteres que intercambian sus grupos acilo como se muestra en la figura 13.



**Figura 13.** Reacción de interesterificación catalizada por lipasa [31].

### 3.3.5 APLICACIONES DE LAS LIPASAS

El interés biotecnológico por las lipasas se debe a su especificidad por enlaces químicos determinados, y a su alta selectividad y/o estereoselectividad. Las aplicaciones clásicas con interés industrial están íntimamente ligadas a los distintos tipos de reacciones que son capaces de llevar a cabo, como las que se indican en la figura 9 a 13 [31], por ejemplo:

#### 1. Reacciones de hidrólisis

- ✓ Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica
- ✓ Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria
- ✓ Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasas
- ✓ Finalidades analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos
- ✓ Resolución de mezclas quirales [29,31].

#### 2. Reacciones de síntesis

- ✓ Síntesis de triglicéridos
- ✓ Síntesis de precursores de péptidos
- ✓ Producción de esteroides para la industria farmacéutica
- ✓ Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica
- ✓ Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes [29,31].

Aunque las lipasas tienen una gran capacidad de catalizar tanto reacciones directas (hidrólisis) como inversas (síntesis), presentan un factor limitante en cuanto a su costo elevado; es por esto que se ha buscado minimizar dicho problema mediante tres posibles procesos:

#### 1. Modificación Física

Consiste fundamentalmente en la inmovilización de la enzima por adsorción física sobre soportes sólidos o mediante su encapsulamiento en materiales insolubles. Hace posible su posterior recuperación al tiempo que incrementa su estabilidad [31].

#### 2. Modificación química

Consiste en la formación de enlaces covalentes entre la lipasa y un material insoluble, una matriz polimérica o entre ellas mismas, con el fin de inmovilizarlas. También se llevan a cabo reacciones selectivas sobre algunos aminoácidos de la enzima para mejorar sus propiedades [31].

#### 3. Ingeniería genética

Permite expresar una determinada enzima, cuyas propiedades sean de interés, en un microorganismo cuyo cultivo a gran escala sea favorable, reduciendo así los costos de producción [31].

### **3.4 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA**

#### **3.4.1 GENERALIDADES**

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida en un soporte, por ejemplo soportes metálicos, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos o células, por su unión a un soporte [30,32].

Algunas de las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas son el aumento de la estabilidad de la enzima, la posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso, la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada, posibilidad de reciclo del catalizador, purificación de productos y prevención del crecimiento microbial [30,31].

Algunos de los inconvenientes del proceso de inmovilización son la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, siempre suele haber una pérdida de la enzima durante el proceso de la inmovilización y el biocatalizador tiende a ser en muchos casos más caro que la enzima nativa [30,32]. En síntesis, la necesidad de inmovilizar una enzima vendrá condicionada por el sistema de reacción que se requiera emplear.

#### **3.4.2 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA POR RETENCIÓN FÍSICA**

##### **1. *Atrapamiento***

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, es de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la



comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína [30].

## **2. Inclusión en membranas**

- **Micro-encapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las micro cápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos [30].
- **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:
  1. Mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana.
  2. Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana [30].

### **3.4.3 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA POR UNIÓN QUÍMICA.**

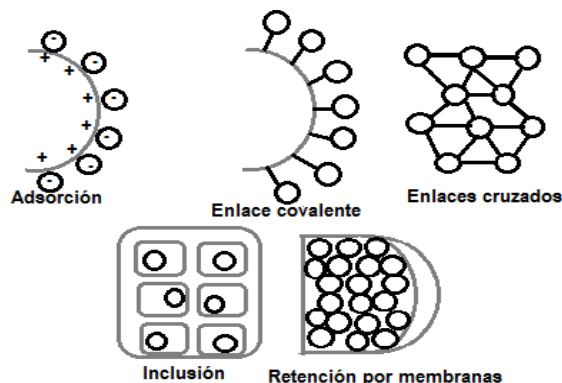
#### **Unión a soportes**

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad,

porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas [30,33].

La unión a soportes se puede llevar a cabo mediante diferentes procesos químicos, como se puede observar en la figura 14, a continuación se describe su proceso.

- **Adsorción:** la inmovilización se produce por la interacción de tipo iónico o fuerzas de atracción débiles, sobre la superficie del soporte.
- **Enlace covalente:** la inmovilización también se realiza sobre la superficie de un soporte, pero al interacción entre la enzima y el soporte es mediante enlace covalente.
- **Enlaces cruzados y auto-inmovilización:** en este grupo no existe soporte propiamente como tal. Las partículas del biocatalizador se logran mediante interacción directa por enlace covalente.
- **Atrapamiento:** formación de una estructura bidimensional, en presencia del biocatalizador, que queda atrapado de forma uniforme en su interior.
- **Sistemas con membranas (micro-encapsulación, membranas preformadas):** en ambos casos la enzima se inmoviliza en el interior de un espacio limitado por una membrana. En el primer caso las micro-cápsulas se producen en presencia de la enzima que queda incorporada en el interior. En el segundo caso, la enzima se introduce en el interior de un sistema con membranas previamente formadas [30,33].



**Figura 14.** Clases de inmovilización por unión química

#### 3.4.4 DESCRIPCIÓN MÉTODO INMOVILIZACION ENZIMATICA VIA ENLACE COVALENTE [30].

Una de las posibilidades de llevar a cabo el método de inmovilización de la enzima *Lipasa* sobre soportes mediante unión por enlaces covalentes, es la activación previa del soporte mediante el uso de compuestos bifuncionales tales como el Glutaraldehído. Una vez activado el *Carrier*, los

grupos aminos primarios de la enzima reaccionan con los grupos aldehídos, los cuales han sido introducidos por modificación de los grupos amino del soporte (usualmente con 2 moléculas de glutaraldehído). El pH usual para realizar la inmovilización sobre estos soportes está entre 7.0-8.5, ya que el soporte activado con glutaraldehído es poco estable a valores altos de pH [6,33]. De esta forma, la molécula de glutaraldehído enlazada a los grupos amino-lisina de la enzima reaccionan covalentemente con la molécula de glutaraldehído enlazada a los grupos amino primarios del soporte estableciendo un enlace covalente multipunto de la enzima-soporte [6,33].

### **3. 5 MATERIALES MAGNÉTICOS**

#### **3.5.1 GENERALIDADES**

Las partículas magnéticas como soporte cuentan con buen tamaño, y a pesar de no ser porosas, permiten inmovilizar aproximadamente 100mg de proteína/gramo de partículas húmedas. El uso de partículas magnéticas puede ser la solución adecuada para superar los problemas de separación, ya que con el uso de un imán se permite la recuperación simple del biocatalizador del medio de reacción [6,34]. En algunas instancias, estos soportes no porosos pueden presentar algunas ventajas comparados con el uso de soportes porosos. Por ejemplo, no tienen problemas de difusión externa. En realidad, los soportes no porosos pueden ser una opción industrial para la utilización en los sistemas sólidos-liquido. Sin embargo, usando este tipo de partículas, la enzima es inmovilizada sobre la superficie externa y por lo tanto, se pierde el efecto protector dado por la inmovilización dentro de los poros de un material poroso. Así, es posible que una enzima inmovilizada sobre estas partículas, pueda sufrir inactivación, especialmente a través de la interacción con burbujas de gas generadas por agitación fuerte o burbujeo con oxígeno [34].

#### **3.5.2 ÓXIDOS DE HIERRO COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.**

El hierro en forma de sesquióxidos, óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos, es muy común en la naturaleza, los cuales son los principales componentes de muchos compuestos minerales, rocas y suelos. Se puede encontrar compuestos de hierro en forma estable en dos estados de oxidación de  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ . La estructura de muchos óxidos de hierro puede ser descrita, en general, como planos compactados de átomos de oxígenos y Fe principalmente ocupando los sitios octahedrales o como en algunos casos, ocupando los sitios tetraedrales. La secuencia de los planos de oxígeno puede ser hexagonal cerrada compactada ABAB (forma  $\gamma$ ) o paquetes cerrados cúbicos ABCABC (forma  $\gamma$ ) [34].

### **3.5.3 OBTENCIÓN DE RESIDUOS AURIFEROS CON PROPIEDADES MAGNÉTICAS**

En los yacimientos aluviales o yacimientos de oro oxidado, se encuentran como residuos las llamadas arenas negras, compuestas en su mayoría de materiales paramagnéticos (hierro y magnetita) y diamagnéticos (feldespato y cuarzo). Los primeros se caracterizan por ser atraídos por un campo magnético mientras que los diamagnéticos son repelidos por dicho campo magnético. En la extracción de oro se lleva a cabo un proceso denominado separación magnética que permite separar la arena negra o algunos óxidos de hierro restantes del oro, para esto se usan magnetos (imanes) fuertes y permanentes, como aquellos utilizados en altoparlantes. Estos imanes se colocan en un recipiente plástico o de cartón. Luego se pasa éste por encima de las partículas a separar. Así las partículas magnéticas son atraídas y luego el material magnético es llevado a una cápsula donde se retira el imán, y las partículas recolectadas caen. Repetir este procedimiento varias veces puede mejorar significativamente la eficiencia de la separación magnética. Si todos los minerales acompañantes son altamente magnéticos (p.ej. magnetita), se puede conseguir, sin necesidad de amalgamación, un alto grado de concentrado de oro, el cual se puede vender o fundir directamente [35].

Existen también separadores magnéticos de alta intensidad, con los cuales se puede también separar ilmenita, hematita, granates, turmalina, etc. del oro. Estos aparatos no son baratos, y pueden ser aplicados en minas más grandes. Los desarrollos nuevos de imanes de alta intensidad (de tierras raras) y relativamente de bajo costo, resultarán posiblemente en pocos años en la construcción de separadores baratos de alta intensidad, que pueden también ser difundidos en la pequeña minería [35].

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA

Las semillas de Higuierilla (*Ricinus communis*), cultivadas en el municipio del Tambo, Departamento del Cauca, fueron suministradas por campesinos del municipio en el mes de enero del 2012, semilla que por sus características físicas fué clasificada por en el herbario de la Universidad del Valle por el Doctor Enrique Javier Peña Salamanca docente del departamento de botánica, concordando con el espécimen bajo el número de clasificación CUVC 37820 y con la siguiente descripción taxonómica.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Especie:	<i>Ricinus communis mayor</i>

Las semillas suministradas con cáscara (ver figura 15) se dejaron expuestas por 16 horas al sol para su posterior descascarado. Después de su secado las semillas se tornaron de color café (ver figura 16), en este momento fue separada la primera cáscara por descascarado manual (ver figura 17) y con ayuda de un mortero la segunda y tercer cáscara, luego la semilla fue sometida a un proceso de selección para elegir aquellos granos que se encontraban en buen estado. Después de quitar la última cutícula de protección quedó descubierto el grano de blanco (ver figura 18) en el cual se encuentra concentrado el aceite de ricino; finalmente con el objetivo de obtener muestras de tamaño homogéneo y aumentar la superficie de contacto fueron triturados los granos (ver figura 19) obteniéndose en total 1,5Kg de grano triturado listo para el proceso de extracción del aceite.



**Figura 15.** Semilla de Higuierilla con cascara en proceso de secado.



**Figura 16.** Semilla de Higuierilla seca con cáscara.



**Figura 17.** Semilla seca con cáscara



**Figura 18.** Grano de Higuierilla sin cáscara

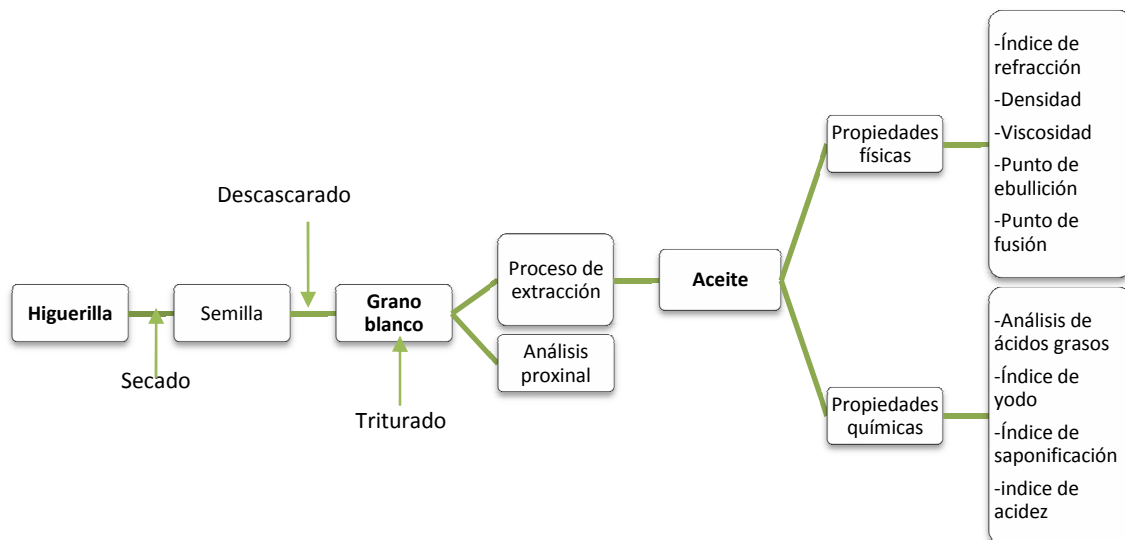


**Figura 19.** Grano blanco y grano triturado de higuierilla.

## 4.2 ANALISIS DEL GRANO

En la figura 20 se describe el procedimiento para la obtención del grano sin cáscara y los análisis a evaluar como: análisis proximal del grano triturado y el posterior análisis físico y químico del aceite extraído.

**Figura 20.** Diagrama de flujo del análisis físico y químico de la semilla de higuierilla



### 4.2.1 ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO

La composición proximal de la semilla de higuierilla, obtenido por descascarado manual de la semilla y posterior trituración de la misma (ver figura 19), se determinó de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC (2005) [36] como se muestra en la tabla 7 (ver fotografías en el anexo A).

**Tabla 7.** Análisis proximal del grano triturado de semilla de Higuierilla.

DETERMINACIÓN	DESCRIPCIÓN	MÉTODO
Humedad	Deshidratación a 100 – 105 °C en estufa a presión constante hasta peso constante	AOAC 950.43 [37]
Ceniza	Calcinación a 550 °C por 4 horas	AOAC 920.153 [36]
Extracto etéreo	Extracción Soxhlet por 4 horas	AOAC 991.36 [38]
Proteína bruta	Kjeldahl: Digestión ácida y destilación de nitrógeno (N x 6,25)	AOAC 968.06 [39]
Fibra bruta	Weende: Digestión ácido-base y calcinación	AOAC 962.09 [40]
Extracto no nitrogenado (ENN)	Por diferencia	

#### 4.2.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE DEL GRANO

Este procedimiento se llevó a cabo mediante el método Soxhlet (figura 21.a), cada muestra de semilla triturada fue empaquetada en una malla de plástico previamente desengrasada la cual posteriormente se envolvió en papel filtro colocándose en una cámara de extracción con capacidad de 300g aproximadamente. Se usó como solvente Hexano y una temperatura de extracción entre 60-80°C. En total se utilizó 1469,027g de grano triturado obteniendo 750mL de aceite de Ricino (figura 21.b), finalmente para la purificación del aceite, se realizó una destilación del solvente.



**Figura 21.** a) Proceso de extracción del aceite por medio del Método Soxhlet. b) Muestra de aceite extraído

#### 4.3 ANÁLISIS DEL ACEITE

##### 4.3.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Para establecer las propiedades físicas y químicas del aceite extraído se efectuaron los siguientes análisis: densidad, índice de refracción, viscosidad, punto de ebullición, punto de fusión, índice de yodo, índice de saponificación e índice de acidez. La metodología empleada para cada determinación se describe a continuación:

- ✓ Densidad: Se calculó de acuerdo con el método oficial de la AOAC 920.212, el cual consiste en determinar, por medio de un picnómetro, la relación de masa de un volumen dado de aceite con la masa de un volumen igual de agua a 20 °C [41].



- ✓ Índice de refracción: Se determinó, de acuerdo con el método oficial de la AOAC 921.08, con un refractómetro Abbé a 20 °C [42].
- ✓ Viscosidad: Se determinó de acuerdo al método de Stokes, el cual consiste en medir el intervalo de tiempo de paso de un fluido a través de un tubo capilar [43].
- ✓ Punto de ebullición: Se determinó por medición de la temperatura en la cual el aceite se inflama a exposición con llama desnuda [43].
- ✓ Punto de fusión: Se determino por medición de la temperatura en la cual el aceite empieza a formar cristales [43].
- ✓ Índice de yodo: Se determinó por el método de Wijs según el procedimiento establecido por la AOAC 920.159. Éste consiste en disolver la muestra en cloroformo y adicionar, posteriormente, un volumen controlado del reactivo de Wijs (ICl preparado a partir de ICl<sub>3</sub> e I<sub>2</sub> en ácido acético glacial). Después de esperar un tiempo (1 hora) para que se complete la reacción, se añade un exceso de KI en solución, el cual reacciona con el reactivo no consumido en la etapa anterior, generando una cantidad equivalente de I<sub>2</sub>. Finalmente, se valora el I<sub>2</sub> con una solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> estandarizada [44].
- ✓ Índice de saponificación: Se determinó de acuerdo con el método oficial de la AOAC 920.160, el cual consiste en saponificar el aceite calentándolo con un exceso de KOH en solución etanólica. La cantidad de KOH consumida se calcula valorando con una solución de HCl estandarizada [45].

#### 4.3.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

La determinación y cuantificación de ácidos grasos se realizó de acuerdo con el método oficial de la AOCS Ce 1c – 89 [46], estandarizado por la empresa ACEGRASAS S.A., el cual consiste en separar los isómeros *trans* y los isómeros *cis* y *cis* interrumpidos por un grupo metileno de los ácidos grasos por cromatografía de gases. Para ello los ácidos grasos del aceite fueron metilados usando el método de esterificación con BF<sub>3</sub>. Para ello se adicionó 4 mL de una solución metanólica de NaOH 0,5 N a 100 mg de aceite. Se calentó durante 5 minutos en un baño maría para hidrolizar los ácidos grasos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se adicionó 5 mL de una solución metanólica de BF<sub>3</sub> al 14%, se recalentó durante 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 10 mL de hexano. Posteriormente se agitó manualmente la mezcla para extraer, en la fase orgánica, los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME), los cuales fueron analizados

en un cromatógrafo de gases Agilent 4890D de la empresa ACEGRASAS S.A., equipado con un detector de ionización de llama (FID). Los FAME se separaron sobre una columna capilar Supelco 2380 (60 m x 0,25 mm d.i. x 0,20 µm espesor de película) bajo las siguientes condiciones de operación:

- ✓ Temperatura del inyector: 255 °C
- ✓ Modo de inyección: Split 1:50
- ✓ Temperatura inicial del horno: 50 °C
- ✓ Gradiente de temperatura: 15 °C/min (0 – 8 min) y 5 °C/min (8 – 32 min)
- ✓ Temperatura final del horno: 240 °C
- ✓ Temperatura del detector: 300 °C
- ✓ Gas portador: Hidrógeno
- ✓ Caudal del gas portador: 0,6 mL/min

Los ésteres metilados de los ácidos grasos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de estándares de C 6:0, C 8:0, C 10:0, C 12:0, C 13:0, C 14:0, C 14:1, C 15:0, C 16:0, C 16:1, C 17:0, C 18:0, C 18:1 Trans, C 18:1 Cis Iso, C 18:1 Cis, C 18:2 tt, C 18:2 ct, C 18: 2 tc, C 18:2 n6 Cis, C 18:3 ttt, C 20:0, C 18:3 ttc-tct, C 18:3 ctt-cct, C 18:3 ctc, C 20:1, C 18:3 n3, C 22:0, C 22:1 n9, C 24:0 (NuChek Prep, Inc.).

#### **4.4 INMOVILIZACION ENZIMATICA**

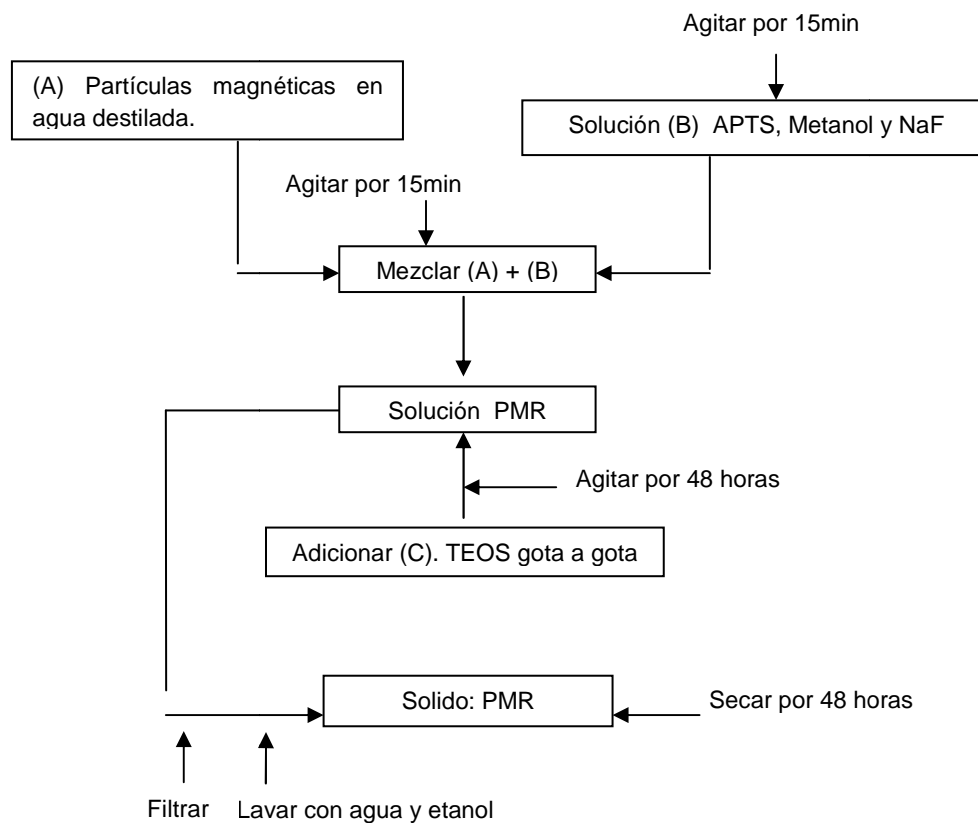
Los procedimientos descritos a continuación desde el apartado 4.4.1 hasta el 4.4.3, se realizaron modificando lo reportado por Dussán 2008[6].

##### **4.4.1. SINTESIS DE PARTICULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS PARA USO COMO SOPORTE DE INMOVILIZACIÓN**

Se suspendieron 8,031g de partículas magnéticas (PM. ver figura 22) en 300mL de agua destilada mezcla rotulada como (A). Paralelamente se preparó una solución (B) constituida por 15 mL de (3-(2-amino-etil-amino) propil) trimetoxisilano (APTS), 45mL de metanol y 15mL de solución acuosa de fluoruro de sodio NaF (1%). Esta mezcla se agitó por 15 minutos. Posteriormente a la mezcla (B), se le añadió la solución que contenía las PM y se continuó agitando por 15 minutos más. Mientras se llevaba a cabo el proceso de agitación se adicionó gota a gota 75mL de una solución rotulada como (C) de tetraetilortosilicato (TEOS). Esta mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. Finalmente se filtró y lavó el sólido dos veces con etanol y agua destilada y se secó en una estufa a 30°C por 48 horas, obteniéndose 8,0g de partículas magnéticas recubiertas (PMR). El proceso se realizó por duplicado obteniéndose en la segunda repetición de 8,030g de PM 8.0g de PMR. En la figura 23 se puede observar en resumen el procedimiento.



**Figura 22.** Partículas magnéticas PM



**Figura 23.** Diagrama general del proceso de síntesis de partículas magnéticas recubiertas PMR.

#### 4.4.2 ACTIVACIÓN DEL SOPORTE MAGNÉTICO CON GLUTARALDEHIDO.

Se adicionaron 8,0g de partículas magnéticas recubiertas (PMR) a 150mL de solución acuosa de glutaraldehído (10%) y se agitó con agitación magnética durante 24horas a temperatura ambiente. El sólido filtrado se lavó con agua destilada y finalmente se secó a temperatura ambiente por 48

horas, obteniendo 7,555g y para el duplicado 7,551 de 8.0g de partículas magnéticas recubiertas activas (PMRA).

#### **4.4.3 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA**

La enzima empleada para el proceso de inmovilización correspondió a la lipasa comercial LIPOSYME CALB producida del microorganismo *Aspergillus niger* que según los reportes presenta buena actividad catalítica en condiciones de reacción de temperaturas de 30-75°C y pH entre 5-9, considerando además que 764mg complejo enzimático equivalen a 200mg de proteína.

El proceso de inmovilización se inició disolviendo 7,815g y 7,841g del complejo enzimático (el segundo valor corresponde al duplicado), en 1L de Buffer de fosfato (pH 7, 0,1M) agitándose hasta disolución completa de la lipasa. A cada solución se le añadió 7,550g de partículas magnéticas recubiertas (PMRA) previamente funcionalizadas con glutaraldehído y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación magnética. Cada solución se filtró y el filtrado se lavó dos veces con buffer de fosfato. Finalmente los precipitados se secaron a temperatura ambiente por 48 horas obteniéndose 5,445g y 5,443g de partículas magnéticas recubiertas activadas con enzima inmovilizada (PMRA-ENZ). Los lavados fueron almacenados para posterior análisis (parágrafo 4.4.4.2).

#### **4.4.4 CARACTERIZACIÓN DE: PM, PMRA Y PMRA-ENZ.**

##### **4.4.4.1 DETERMINACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES**

Mediante el uso de espectroscopia infrarroja se llevó a cabo el seguimiento de los productos obtenidos en la síntesis tanto del recubrimiento del soporte, como la activación con glutaraldehído y posterior inmovilización de la Lipasa. Este proceso se llevó a cabo en el espectrofotómetro IR, THERMO ELECTRON Niccolet IR200.

##### **4.4.4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS LAVADOS DE PMRA-ENZ POR EL MÉTODO DE LOWRY**

Se preparó una solución madre de seroalbúmina bovina de 200ppm, de la cual se extrajeron alícuotas de 0,25mL, 0,5mL, 1,0mL, 2mL, 3mL, 5mL y 7,5mL y se aforaron a 10mL con agua destilada, obteniéndose concentraciones de 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm, 100ppm y 150 ppm de seroalbúmina bovina respectivamente.

Una vez preparada la curva, se prepararon los siguientes reactivos indispensables en el proceso:

- ✓ Solución D: carbonato sódico al 2% en NaOH
- ✓ Solución E: sulfato cúprico al 1%

- ✓ Solución F: Tartrato sódico-potásico al 2%
- ✓ Reactivo de Lowry: 50mL de la D con 0.5mL de E y 0.5mL de la solución F.

Se tomó 5mL de cada concentración preparada de seroalbúmina bovina, a cada alícuota se le adicionó 3mL del reactivo de Lowry dejando pasar entre cada adición 1minuto, 10minutos después se adicionó 0,3mL de reactivo Folin-Ciocalteau dejando en reposo cada muestra por 30minutos, finalmente se midió la absorbancia a 761nm en un espectrofotómetro Ultravioleta Visible THERMO, GENESIS 6 de la Unidad de Análisis industriales de la universidad del Cauca. Este procedimiento fue aplicado para las muestras tomadas de cada proceso de lavado realizado durante el proceso de inmovilización, con el objetivo de cuantificar la enzima sin inmovilizar en equivalentes de proteína.

#### **4.5 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

##### **4.5.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

La determinación de la actividad enzimática se realizó siguiendo las condiciones de reacción expuestas en la tabla 8 y 9 para el experimento 4. Una vez se dio inicio a la reacción, se extrajo cada hora una alícuota de 0,5mL de la muestra reaccionante y se calentó a 50°C para detener la reacción, posteriormente se aforó hasta 5mL con etanol absoluto y se tituló con KOH (0,06M). La actividad enzimática es expresada por la cantidad de ácido Ricinoléico que se gasta por unidad de tiempo [6,47].

##### **4.5.2 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE RICINO CON ÉTANOL**

La producción de biodiesel se llevó a cabo mediante la reacción de transesterificación con lipasa libre e inmovilizada, usando aceite comercial (AC.C) de ricino y el aceite extraído (AC.EXT) de las semillas donadas por los campesinos del Municipio del Tambo.

Las condiciones de reacción se describen a continuación en las tablas 8 y 9, los experimentos 1 y 2 corresponden a la transesterificación del aceite comercial de ricino, mientras que los experimentos 3 y 4 a la transesterificación del aceite de ricino extraído. El experimento A se llevó a cabo con lipasa libre y el experimento B con Lipasa inmovilizada. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

**Tabla 8.** Condiciones de reacción de transesterificación del aceite de Ricino con Lipasa libre.

Aceite	Experimento A	EtOH: AC	Carga enzimática	T°C	%H <sub>2</sub> O
AC.C	1A	3:1	0.05%	35	10
AC.C	2A	2:1	0.05%	30	10
AC.EXT	3A	3:1	0.05%	35	10
AC.EXT	4A	2:1	0.05%	30	10

**Tabla 9.** Condiciones de reacción de transesterificación del aceite de Ricino con Lipasa inmovilizada.

Aceite	Experimento B	EtOH: AC	Carga enzimática	T°C	%H <sub>2</sub> O
AC.C	1B	3:1	0.05%	35	10
AC.C	2B	2:1	0.05%	30	10
AC.EXT	3B	3:1	0.05%	35	10
AC.EXT	4B	2:1	0.05%	30	10

#### 4.5.3 ANÁLISIS DEL BIODIESEL OBTENIDO.

##### 4.5.3.1 IDENTIFICACIÓN DE ESTERES

La determinación de ésteres se realizó de forma cualitativa siguiendo el procedimiento de la reacción con hidroxilamina para formar ácidos hidroxámicos que producen una coloración rojiza en presencia de iones férricos. Se determinó cualitativamente debido a que los posibles productos de la reacción de transesterificación tales como diacilglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres al dar también positiva esta prueba imposibilita la determinación cuantitativa única de los esteres etílicos (biodiesel).

En tubos de ensayo se adicionaron 0.5mL de una solución de clorhidrato de hidroxilamina 1N, en etanol y 50µl de las correspondientes muestras a valorar (productos de la reacción de transesterificación). A cada tubo se le añadió gota a gota, una solución de KOH 2N en metanol hasta que la mezcla alcanzó un pH de 9-10 y se completó con otras 4 gotas adicionales de la misma solución de KOH 2N. Se calentaron los tubos hasta iniciar la ebullición colocándolos en un vaso de precipitado con agua llevando a cabo agitación. Se enfrió y se añadió gota a gota HCl (2N) hasta un pH aproximado de 3. Finalmente, se adicionó una gota de una solución de FeCl<sub>3</sub> al 10%, generándose como se esperaba una coloración roja producto de los esteres presentes.

#### 4.5.3.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Para establecer las propiedades físicas y químicas del Biodiesel obtenido se efectuaron los siguientes análisis: densidad, índice de refracción, viscosidad, punto de inflamación, índice de yodo, número de cetano, Glicerina libre, Glicerina total y destilación. La metodología empleada para cada determinación se describe a continuación:

- ✓ **Densidad:** Se calculó de acuerdo con el método oficial de la AOAC 920.212, el cual consiste en determinar, por medio de un picnómetro, la relación de masa de un volumen dado de aceite con la masa de un volumen igual de agua a 20 °C [41].
- ✓ **Índice de refracción:** Se determinó, de acuerdo con el método oficial de la AOAC 921.08, con un refractómetro Abbé a 20 °C [42].
- ✓ **Viscosidad:** Se determinó por medición a temperatura constante de 40°C, la velocidad de flujo 78,53rad/seg, tiempo 120 segundos [43].
- ✓ **Punto de inflamación:** Se determinó por medición de la temperatura en la cual el producto de la transesterificación se inflama a exposición con llama desnuda [43].
- ✓ **Índice de yodo:** Se determinó por el método de Wijs según el procedimiento establecido por la AOAC 920.159. Éste consiste en disolver la muestra en cloroformo y adicionar, posteriormente, un volumen controlado del reactivo de Wijs (ICl preparado a partir de ICl<sub>3</sub> e I<sub>2</sub> en ácido acético glacial). Después de esperar un tiempo (1 hora) para que se complete la reacción, se añade un exceso de KI en solución, el cual reacciona con el reactivo no consumido en la etapa anterior, generando una cantidad equivalente de I<sub>2</sub>. Finalmente, se valora el I<sub>2</sub> con una solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> estandarizada [44].
- ✓ **Número de Cetano:** ignición rápida seguida de un quemado total y uniforme del carburante. Descrito por el método EN ISO 5165 [43].
- ✓ **Glicerina libre y Glicerina total:** se determinó siguiendo el método de ensayo descrito. EN 14105, EN 14106 [43].
- ✓ **Destilación:** se determinó siguiendo el método ASTM D 86. Temperatura en la cual los esteres etílicos empiezan a destilarse, 90% destilado [43].

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISIS DEL GRANO

#### 5.1.1 ANÁLISIS PROXIMAL DEL GRANO

Actualmente dada la problemática de escases del petróleo, y los graves problemas de contaminación ambiental, se busca desarrollar materias primas con alto contenido de aceites de diferentes especies oleaginosas. En este caso la Higuierilla ha despertado gran interés para la elaboración de biodiesel debido a su alto contenido de aceite, dato que se puede corroborar en el análisis de composición proximal del grano triturado de Higuierilla realizado en el presente trabajo; se observa que los componentes mayoritarios son la grasa y la fibra, lo cual concuerda con estudios realizados por otros investigadores y corrobora la importancia de esta semilla desde el punto de vista industrial dado a su alto nivel de grasa. Los resultados completos del análisis proximal del grano triturado de la semilla de Higuierilla se muestran en la tabla 10.

Teniendo en cuenta los reportes en la literatura, el contenido de grasa (54.4%) en la parte blanda y blanca del la semilla (Grano) de Higuierilla se encuentra dentro de los límites reportados por CEA (*Cultivos energéticos alternativos* [14]) (35-55%) y por encima del reportado por Valderrama (48-50%) en su artículo “La Higuierilla y su principal producto, el aceite de ricino” [15]. Las diferencias que presentan estos dos autores no solamente en el componente grasa, sino también humedad y cenizas, se puede deber a la variedad de semilla utilizada ya que no la reportan, así como de los factores tanto físicos como ambientales del cultivo, principalmente dada por las condiciones de las regiones CEA (Colombia) y Valderrama (Chile) tales como: la precipitación, la altitud, temperatura, el ciclo germinativo y principalmente el tipo y calidad del suelo presente en estas. Sin embargo cabe resaltar que la semilla de estudio *Ricinus communis mayor* cultivada en el municipio del Tambo presenta un mayor contenido de aceite de los reportados, lo cual podría ser importante para futuros estudios sobre cultivos realizados con el fin de obtener semilla destinada para la producción de biocombustible.

**Tabla 10.** Resultados del análisis proximal del grano triturado de Higuierilla

Componente	Herrera (2012)	CEA [14] (2009)	Valderrama [15]
Humedad (%)	3,14 ± 0,0	3,70	4-8
Cenizas (%)	3,02 ± 0,02	6,27	2-3
Grasa (%)	54,45 ± 1,36	35-55	48-50
Proteína (%)	4,11 ± 0,01	---	---
Fibra Bruta (%)	20,49 ± 0,38	---	---
ENN (%)	14,79 ± 0,0	---	---



## **5.2 ANÁLISIS DEL ACEITE DE RICINO**

Goering et al. (1982) propusieron la realización de unos test ASTM (American Standard Testing Materials) para caracterizar, evaluar y comparar las propiedades como combustible de los aceites vegetales. También las relacionaron con la composición química de los mismos, mediante tests A.O.C.S (American Oil Chemist Society), por tanto de dichas propiedades físico-químicas dependerá, en gran medida, el funcionamiento óptimo del aceite vegetal como combustible [48]. En la tabla 11 se muestran los resultados evaluados de algunas de estas propiedades para el aceite de ricino.

### **5.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS**

La densidad y el índice de refracción son valores que no varían significativamente para un aceite determinado cuando está puro y fresco pero que se afectan por la edad, rancidez y cualquier tratamiento especial al cual sea sometido y guardan una relación directamente proporcional con el peso molecular de los ácidos grasos y el contenido de ácidos grasos insaturados e hidroxilados presentes en un aceite [49].

El aceite de Ricino que se obtuvo de la extracción usando el método Soxhlet, presenta un color amarillo (ver figura 21) y un aroma desagradable propio del aceite. Presenta un leve olor a solvente Hexano después de haberse realizado la evaporación de este para la purificación del aceite.

De acuerdo a los valores obtenidos y según los Test evaluados por la ASTM, respecto a las demás propiedades físicas (ver tabla 11), se tiene que el aceite de ricino alcanza un punto de ebullición de (309,7 °C) dado a su valor elevado con respecto a otros aceites destinados para el mismo fin como aceite de colza (285°C) y aceite de girasol (215°C) [50], se establece que el aceite de higuerrilla permite un almacenamiento, transporte y uso más seguros; del punto de fusión el cual determinará el comportamiento del combustible en ambiente frío (fluidez, temperatura límite de filtrabilidad) y permite prever el funcionamiento del sistema de alimentación del motor y, más particularmente de los filtros del combustible, se reporta un valor del (-10,1°C), valor que se establece dentro del rango permisivo puesto que valores por debajo de -15°C deben ser calentados antes de arrancar el motor. Otros parámetros físicos considerados tal vez como los más importantes son la viscosidad y la densidad, dado que valores altos influyen sobre el funcionamiento del sistema de inyección, bombeo y fluidez del combustible, la mecánica de ruptura, atomización y pulverización de los inyectores, prácticamente constituyen los mayores obstáculos para el empleo de aceites vegetales como combustible de motores Diesel. Con respecto a la viscosidad su valor es más de 10 veces superior al que presenta el gasóleo (2-4,5 cSt) [48]. El valor para el aceite de ricino es de (260,76 cSt a 40°C) comparado con aceite de colza (78

cSt) y aceite de girasol 65.8 (cSt) [50] se puede observar que el del aceite de ricino es mucho mayor, sin embargo aunque esta propiedad sea de gran importancia para el buen funcionamiento de inyección, se puede considerar el uso de este como materia prima para la producción de biodiesel, ya que dependiendo de las condiciones de reacción de transesterificación se puede disminuir este valor, afectando de paso también el valor de la densidad del aceite de estudio que correspondió a (0,95g/mL) mientras que para aceites como de girasol se reportan valores más bajos (0.86 g/mL) y colza (0.91 g/mL).

### 5.2.2 PROPIEDADES QUÍMICAS

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en un aceite y de gran valor para la identificación del mismo, ya que permanece casi inalterada por ligeros cambios en su estado [50]. El resultado obtenido para el aceite de Higuierilla (ver tabla 11), da un indicio de su grado de insaturación, lo cual hace que sea susceptible a procesos de rancidez oxidativa. Éste valor ( $76,97 \pm 0.41$ ) se encuentra por debajo de los valores reportados por la A.O.C.S para los aceites destinados como biocombustibles, cuyo índice de yodo es alto, entre ellos, el aceite de girasol (118 - 145 g de  $I_2/100$  g aceite) y el de Colza (141 – 120 g de  $I_2/100$  g aceite). No obstante aceites que presentan elevada esta propiedad pueden producir una mayor descomposición de los mismos en otros productos que dan origen a compuestos que no se queman y que quedan adheridos al interior de la cámara de combustión, generando por tanto una acumulación de residuos en el interior del motor [49]. Este hecho conlleva a resaltar el aceite de Higuierilla debido a que no requeriría pretratamientos o suministro de aditivos para mejorar sus propiedades de degradación térmica.

El índice de saponificación es un valor inversamente proporcional al peso molecular de los ácidos grasos presentes en un aceite, debido a que los ésteres de los ácidos de bajos pesos equivalentes, requieren más base para la saponificación que el mismo peso en gramos de aquellos de mayor peso equivalente[50]. El valor encontrado para el aceite de Higuierilla se encuentra por debajo del rango reportado por la A.O.C.S (176-184 mg KOH/g aceite) pero corrobora la presencia de ácidos grasos de alto peso molecular.

Comparando las propiedades físicas y químicas (ver tabla 11) determinadas para el aceite extraído de la semilla de Higuierilla cultivada en el Municipio del Tambo (Departamento del Cauca), con las Reportadas por la A.O.C.S (ver tabla 5), se puede observar la concordancia existente entre ellas y por ende, comprobar el potencial de este aceite para uso como biocombustible.

**Tabla 11.** Propiedades Físicas y Químicas del Aceite extraído de las semillas de Higuierilla

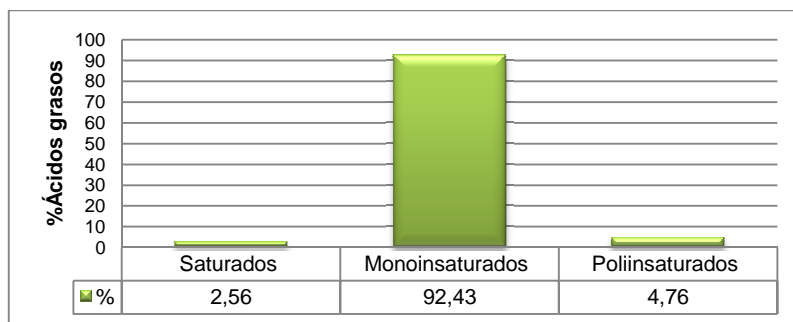
CONSTANTE	RESULTADO (2012)
Densidad (g/mL) a 25 °C	0,95 ± 4,36E-4
Índice de refracción a 25 °C	1,47 ± 1,0E-4
Viscosidad a 40 °C (cSt)	260,76 ± 0,45
Punto de ebullición °C	309,70± 1,12
Punto de Fusión °C	-10,10± 0,17
Índice de yodo (g de I <sub>2</sub> /100 g aceite)	76,97 ± 0.41
I. de saponificación (mg KOH/g aceite)	172,58 ± 0,51

### 5.2.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

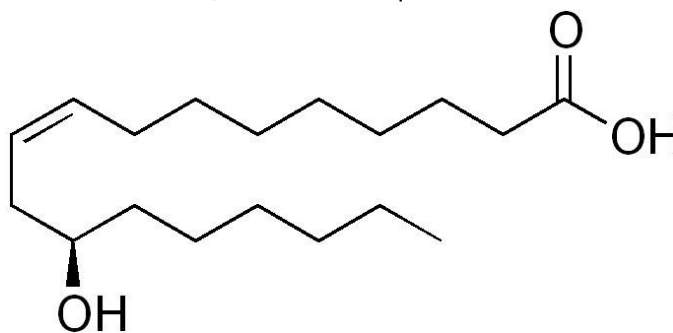
Según los resultados expuestos en la tabla 12, el aceite de Ricino posee un alto grado de insaturación (97,19%). A pesar de esto, el índice de yodo (76,97 g de I<sub>2</sub>/100 g aceite, ver tabla 11) no es tan elevado en comparación con aceites como el de colza y el de girasol, puesto que su principal constituyente es el ácido Ricinoléico (88.86%) el cual es mono insaturado; en menor proporción se encuentran los ácidos poli insaturados (4.76%) como los ácidos  $\alpha$ -linoléico (C18:3 n-3) y linoléico (C18:2 n6 *cis*) y los ácidos grasos saturados (2.56%) Ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) como se observa en la figura 24.

**Tabla 12.** Perfil de ácidos grasos del aceite de Ricino.

ÁCIDO GRASO	EXPERIMENTAL g/100 g DE ACEITE	REPORTADO POR LA LITERATURA [51]
C16:0	1.18	0.86
C18:0	1.38	1.01
C18:1 <i>Cis</i>	3.57	2.63
C18:1, OH	88.86	89.54
C18:2 n6 <i>Cis</i>	4.28	4.10
C18:3 n3	0.48	0.36

**Figura 24.** Composición de ácidos grasos del aceite de Higuierilla, agrupados según su grado de saturación

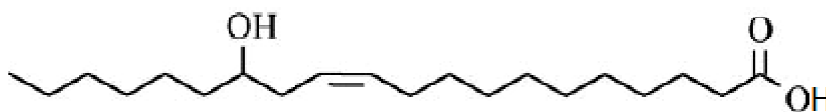
Debido a que el aceite de Ricino está compuesto en un alto porcentaje de ácido Ricinoléico (88.86%) el cual estructuralmente contiene en su cadena mono insaturada un grupo Hidroxilo (ver figura 25), el costo de producción del biodiesel de Ricino podría ser menor al de otras fuentes de aceites vegetales, debido a su solubilidad en alcohol lo cual permite que la transesterificación pueda ocurrir a temperatura ambiente, además no requeriría el uso de aditivos [52].



**Figura 25.** Estructura química del ácido Ricinoléico.

Los resultados concuerdan con otros estudios realizados (ver tabla 4), los cuales ratifican que el aceite de Ricino está constituido esencialmente por el ácido Ricinoléico cuyo porcentaje varía en un rango de 80-90%, la variación puede estar sujeta a la variedad de semilla de higuera, al ciclo germinativo, a las propiedades del suelo, a la altitud, a las precipitaciones, temperatura, etc.

Comparando la composición de ácidos grasos del aceite de Ricino con el de otras semillas oleaginosas como el de Colza y Girasol, las cuales han ocupado los primeros lugares entre los cultivos oleaginosos para la producción de biodiesel, se puede confirmar que dicho aceite comercial es el único que contiene hidroxiácidos grasos, por su alto contenido de ácido Ricinoléico (88.86%), el cual se encuentra fundamentalmente haciendo parte del triglicérido simple tri-ricinoleína. La presencia del grupo funcional hidroxilo, en adición al grupo carboxilo y al enlace doble, hace por tanto que el ácido Ricinoléico tenga potencial para la industria oleoquímica. La importancia oleoquímica de los hidroxiácidos por tanto ha motivado la realización de investigaciones orientadas a desarrollar plantas oleaginosas que produzcan aceites ricos en estos compuestos. Una de tales plantas es la denominada *Lesquerella fendleri*, de la cual se obtiene aceite que puede llegar a tener hasta el 70% de ácido lesquerólico (C<sub>20</sub>:1, OH) (figura 26) cuyos alquilésteres han sido recomendados también como aditivos de lubricidad para el combustible diesel convencional, pero sigue ocupando el primer lugar el aceite de ricino por mayor concentración del ácido Ricinoléico [51].



**Figura 26.** Estructura química del ácido lesquerólico.

### 5.3 INMOVILIZACIÓN ENZ

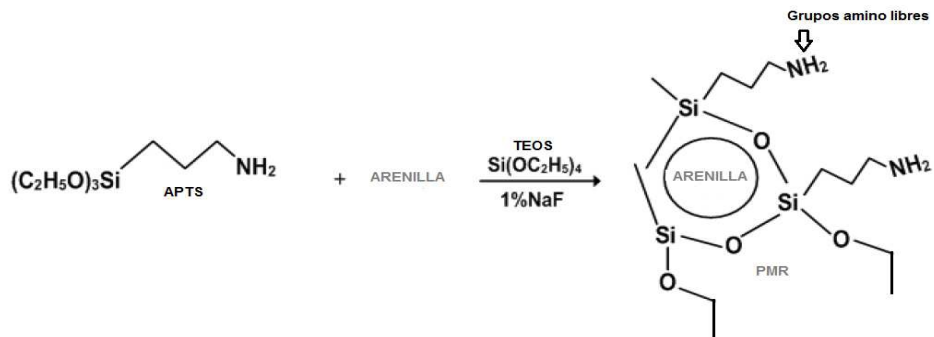
#### 5.3.1 RECUBRIMIENTO DE

El soporte utilizado para las partículas, llamadas arenas negras, y los cuales fueron donados por el Bordo en el Departamento de Bordo en el Departamento de Bordo, compuesta en su mayoría por sílice, se caracterizan por ser atráctivas y además de poder darle un recubrimiento, se escogió la arenilla (ver figura 27) para evitar la transesterificación y evitar la pérdida de recuperación para posteriores procesos.



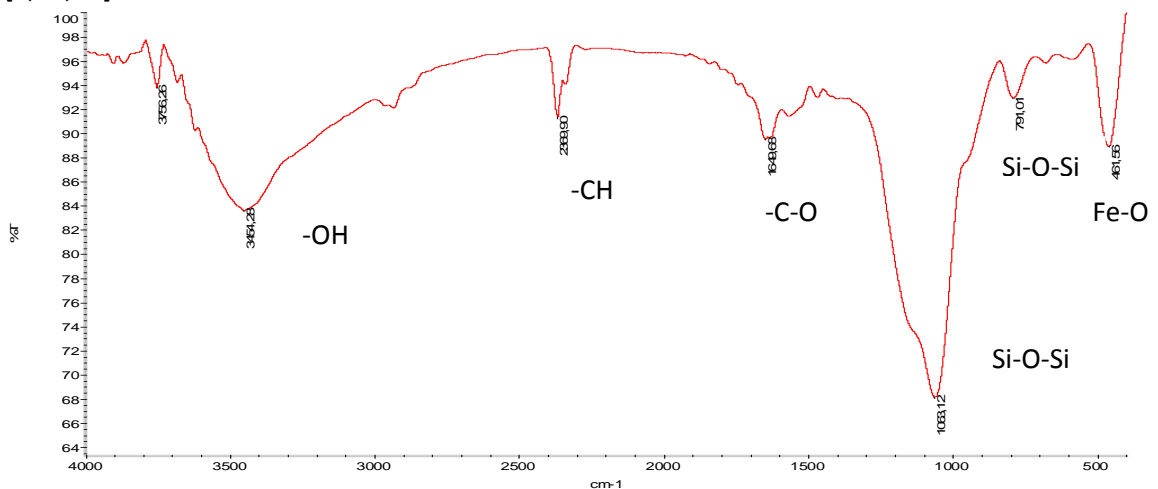
**Figura 27.** a) Partículas magnéticas de las PMR.

El recubrimiento de las partículas en el soporte en la inmovilización de la enzima aportó grupos silanos que al ser sometidos a una solución de APTS aportó grupos amino. Al ser sometido a una solución de Glutaraldehído se pudo observar que se genera una reacción de condensación, la cual se evidenció en el color que se volvió mucho más grande que la muestra original. La pérdida en la respuesta de la muestra en la figura 27. a) para las partículas utilizadas 8,031g y para las partículas magnéticas resultó ser aproximado del 99,61% en la recuperación.



**Figura 28.** Reacción de polimerización, recubrimiento de las partículas magnéticas. (Imagen modificada [6])

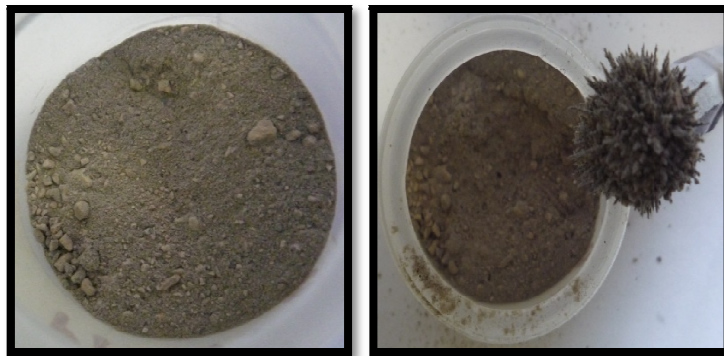
Para comprobar que las partículas magnéticas (PM) fueron recubiertas tal y como se muestra en la figura 26.b y en la reacción de la figura 27, se tomó un espectro FT-IR (ver figura 29) encontrándose lo siguiente: Banda a 3454 cm<sup>-1</sup> (modo estiramiento) correspondiente a los grupos hidroxilo (referenciadas a la presencia de H<sub>2</sub>O en las muestras). Bandas cercanas a los 2900 cm<sup>-1</sup> debidas a enlaces C-H (modo estiramiento), banda alrededor de 1640 cm<sup>-1</sup> debida al enlace -C-O, la señal de mayor importancia en el espectro es la que aparece en 1063 y 791 cm<sup>-1</sup> debidas a los enlaces Si-O-Si (modo estiramiento) y banda en 461 cm<sup>-1</sup> debida a los enlaces Fe-O. El espectro obtenido para este compuesto coincide con los reportados en la literatura y los que reposan en diferentes bases de datos de espectros, además por el reportado por Dussán (ver figura 33) en su trabajo inmovilización de enzimas en Nanoestructuras magnéticas para aplicaciones industriales. [6,53,54].



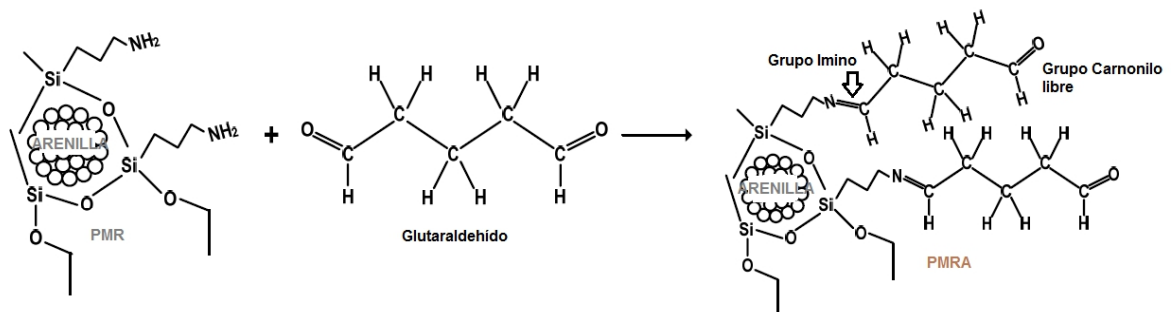
**Figura 29.** Espectro FT-IR (KBr) de las partículas magnéticas recubiertas (PMR)

### 5.3.2 ACTIVACIÓN DEL SOPORTE MAGNÉTICO

Las partículas magnéticas recubiertas se activaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.4.2, obteniéndose partículas sólidas de color café claro (ver figura 30.a) evidenciando un cambio con las PMR de color gris y con una respuesta magnética cualitativamente mucho menor que el presentado por las partículas de partida (ver figura 30.b). Se empleó para este procedimiento 8,0g de PMR e igual valor para el duplicado y una solución de 150mL de glutaraldehído cuya función fue enlazarse mediante enlaces covalentes generando grupos imino (-C=N-) (ver figura 31) sobre las partículas magnéticas recubiertas que presentaban grupos amino libres aportados por la solución de APTS en el proceso de recubrimiento. Una vez enlazado el glutaraldehído al soporte se obtuvo en promedio de los duplicados 7,553g de las nuevas partículas magnéticas recubiertas y activadas (PMRA) con un porcentaje de rendimiento del proceso aproximado del 94% evidenciándose una disminución en cuanto al proceso anterior (recubrimiento de PM). Finalmente las PMRA obtenidas se caracterizan por presentar grupos carbonilo libres (ver figura 32) que serán usados para el posterior proceso de inmovilización enzimática.



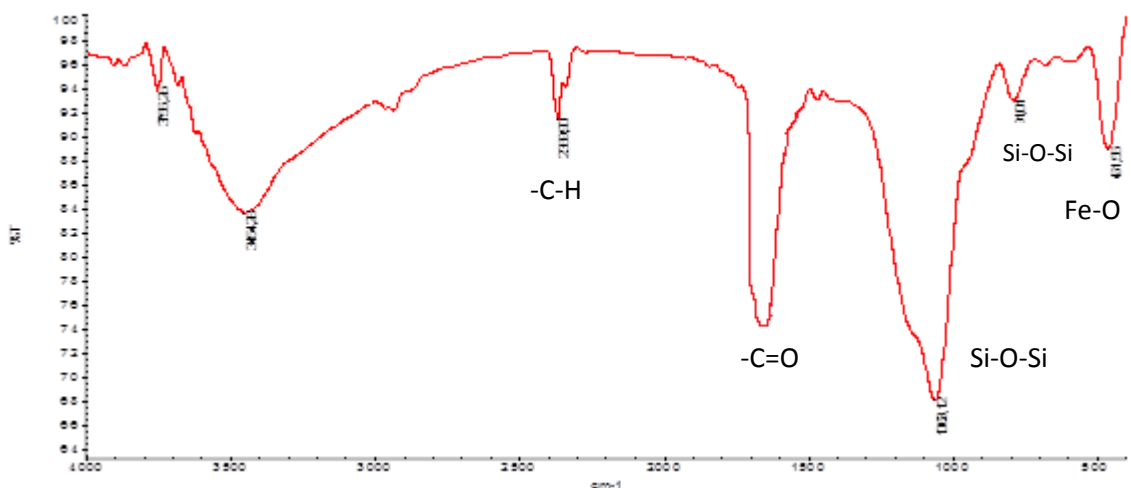
**Figura 30.** a) Partículas magnéticas recubiertas y activadas PMRA, b) PMRA respuesta magnética.



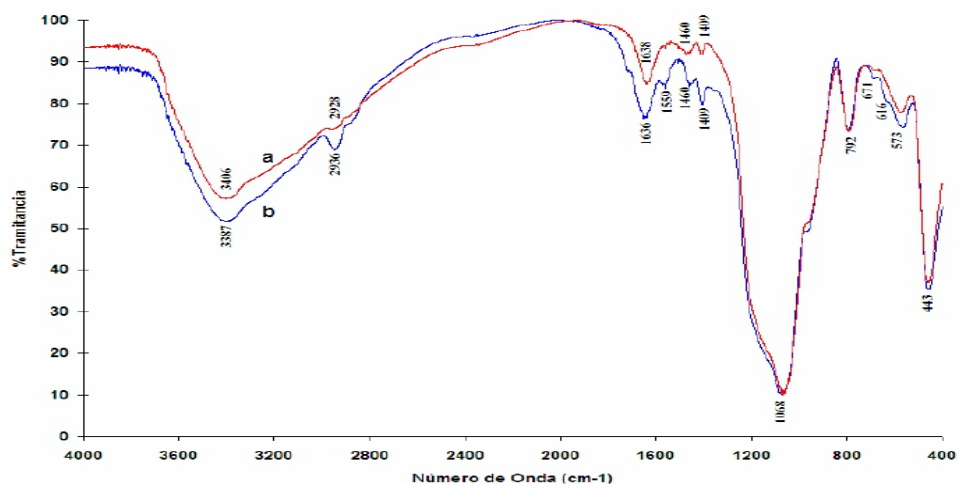
**Figura 31.** Reacción de activación de las partículas magnéticas. (Imagen modificada [6])

Para la determinación de las funciones químicas presentes en las PMRA se tomó un espectro FT-IR (ver figura 32), presentando señales muy similares a las obtenidas para el espectro FT-IR de las

PMR (ver figura 29), encontrándose las bandas ya mencionadas en el parágrafo 5.3.1, además de las bandas que aparecen aproximadamente a  $1700\text{cm}^{-1}$  correspondiente al enlace  $\text{C}=\text{O}$  (modo estiramiento) y la banda  $\text{-C-H}$  a los  $2960\text{ cm}^{-1}$  (modo estiramiento) ambas características del grupo carbonilo libre presentes en el soporte y aportadas por el glutaraldehído enlazado covalentemente a este. Se debía esperar una banda aproximadamente alrededor de  $1090\text{cm}^{-1}$  generada por el enlace imino ( $\text{-C}=\text{N-}$ ) pero la banda  $1063,12\text{cm}^{-1}$  podría estar solapando dicha señal lo cual no se puede evidenciar a simple vista. El espectro de la figura 29 y 32 fue comparado con los espectros de la figura 33 reportados por Dussán [6] encontrándose señales similares que permiten constatar el recubrimiento y la activación del soporte.



**Figura 32.** Espectro FT-IR (KBr) de las partículas magnéticas recubiertas y activadas (PMRA)



**Figura 33.** Espectro FT-IR reportado por Dussán [6] para a) partículas magnéticas recubiertas y b) partículas recubiertas y activadas (PMRA)



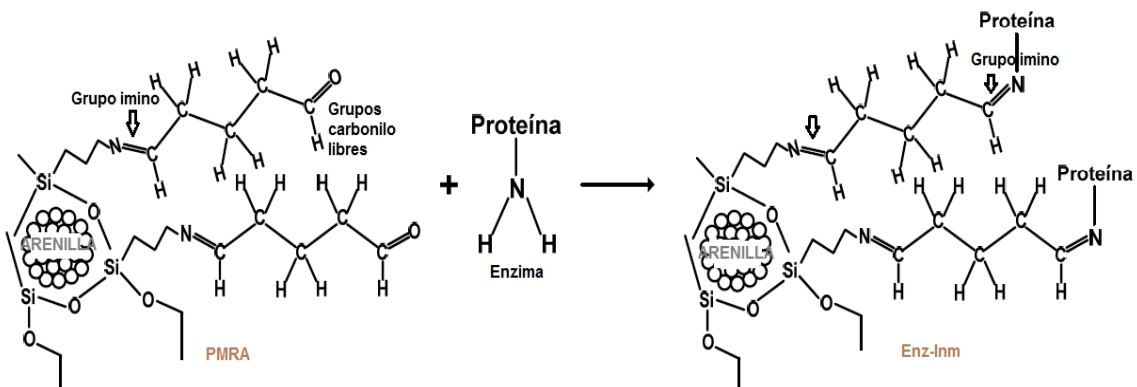
### 5.3.3 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA

Con el soporte (PMRA) activado se realizó el proceso de inmovilización de la enzima Lipasa siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4.3; se obtuvo en promedio 5,444g de partículas sólidas de color café (PMRA-ENZ) (ver figura 34) partiendo de 7,550g de partículas magnéticas recubiertas y activadas (PMRA) con un porcentaje de rendimiento aproximado del 72% notablemente en cada proceso se observó una disminución en dicho porcentaje, debido a la pérdida de material en cada proceso de filtrado, lavado y secado, sin embargo manteniéndose en un rango promisorio (>70%) para efectuar un proceso a nivel industrial.

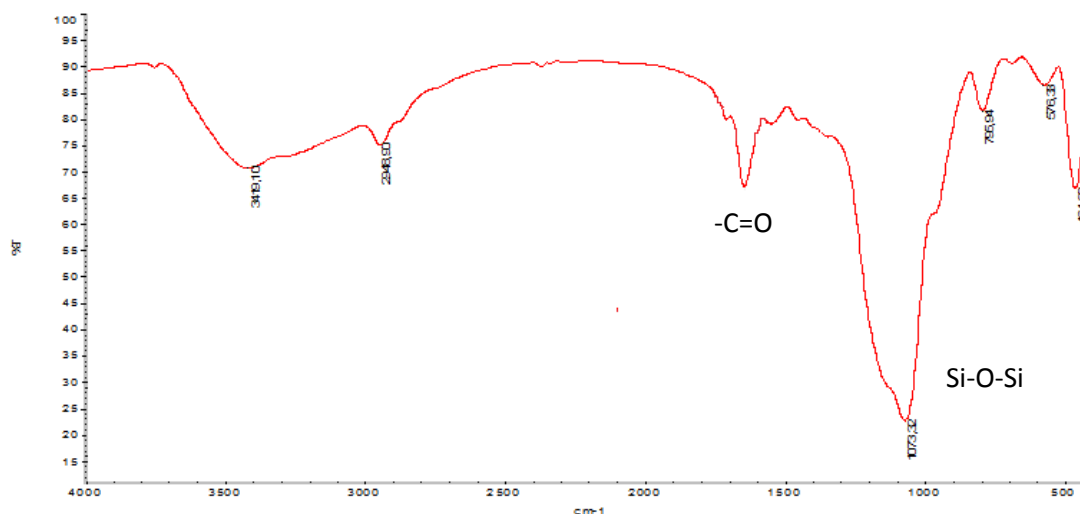


**Figura 34.** a) Enzima inmovilizada y su respuesta magnética.

Por la activación del soporte con el reactivo bifuncional glutaraldehído las PMRA presentaban grupos carbonilo libres, que se enlazaron a los grupos amino libres de la enzima durante el proceso de inmovilización, mediante enlaces covalentes formando nuevamente enlaces imino ( $-C=N$ ) como se muestra en la reacción de la figura 35; en el espectro FT-IR tomado para estas nuevas partículas (ENZ-INM) (ver figura 36) se identifica un cambio con el espectro de las PMRA (ver figura 32) en cuanto a la disminución de la señal de la banda del grupo carbonilo ( $-C=O$ ) aproximadamente  $1700\text{cm}^{-1}$ , resultado interpretado como señal de formación de los nuevos enlaces imino, nuevamente este último enlace ( $-C=N-$ ) no se observa en el espectro por posible solapamiento con la banda generada por el enlace Si-O-Si.



**Figura 35.** Reacción de Inmovilización enzimática. (Imagen modificada [6])



**Figura 36.** Espectro FT-IR (KBr) Enzima inmovilizada (Enz-inm)

#### 5.3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS LAVADOS DE PMRA-ENZ POR EL MÉTODO DE LOWRY.

Para la determinación cuantitativa de la proteína presente en los lavados realizados al soporte con la enzima inmovilizada (PMRA-ENZ), se seleccionó el método colorimétrico de Lowry permitiendo determinar la cantidad de enzima en equivalentes de proteína que quedó sin inmovilizar. La ventaja de este método colorimétrico es la extrema sensibilidad que presenta (0.1-2.0  $\mu\text{g}$  (proteína)/mL) ya que es capaz de detectar cantidades del orden de 10 microgramos de proteína. La reacción general ocurre bajo condiciones alcalinas de  $\text{Cu}^{++}$  formando un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas y una reducción del cobre a  $\text{Cu}^+$ . El  $\text{Cu}^+$  así como los grupos R de Tirosina, Triptófano y Cisteína de la proteína reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteau (figura 37), reactivo que primero genera un producto inestable que se reduce lentamente a azul de molibdeno/tungsteno. El complejo coloreado obtenido de la aplicación de esta técnica empleando las alícuotas de los lavados de las PMRA-ENZ se llevaron a un espectrofotómetro UV-VIS realizándose un barrido entre 250 y 800nm, presentando un máximo de absorción en la longitud de onda de 761nm.

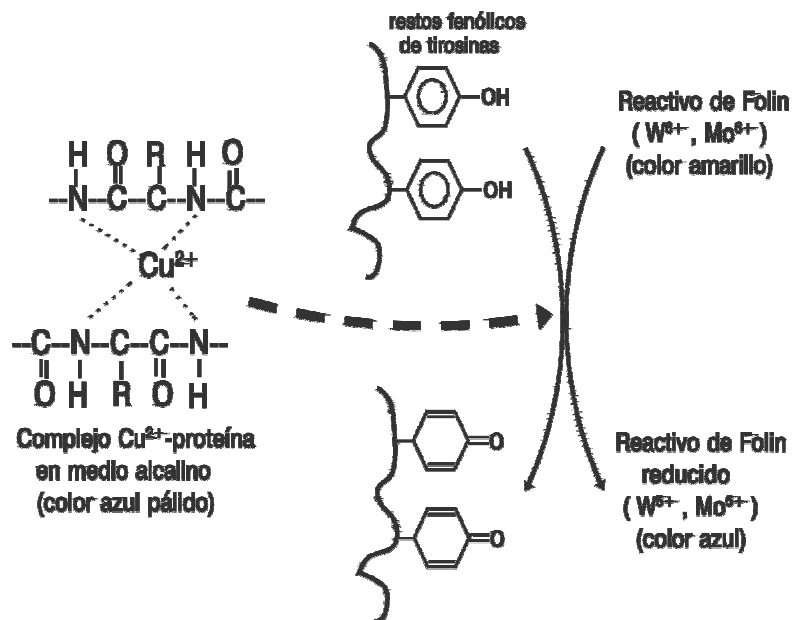
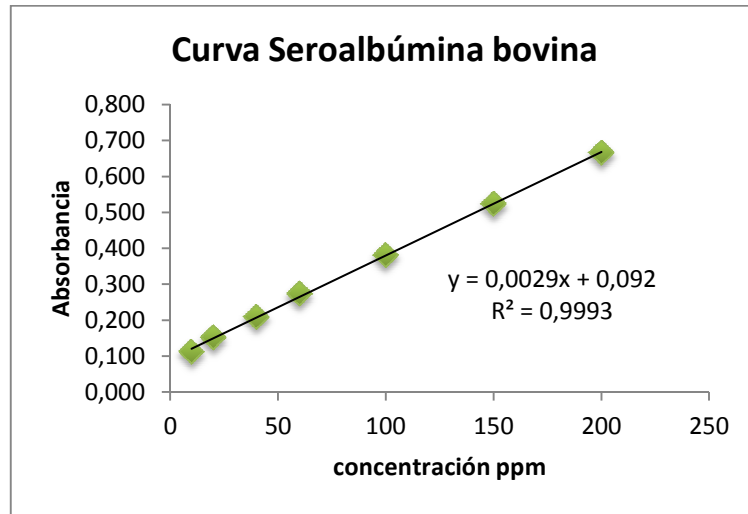


Figura 37. Complejo coloreado formado por la acción del reactivo de Folin

Los resultados de la curva patrón de Seroalbúmina bovina empleada para tal proceso se muestran en la tabla 13, la gráfica para la curva se puede apreciar en la figura 38 mostrando un coeficiente  $R^2$  (0,9993) indicando que el 99% de los puntos experimentales están sobre una recta con pendiente positiva, es decir que existe una buena correlación entre las variables de la curva “absorbancia y concentración”; así mismo se obtuvo una expresión  $y = 0,0029x + 0,092$  que permitió calcular el valor de la concentración de proteína presente en las muestras L1 y L2 tomadas en el proceso de lavado del soporte con la enzima inmovilizada, proceso realizado por duplicado. Según las especificaciones de la enzima Lipasa usada en el presente trabajo, 764mg de complejo enzimático equivale a 200mg de proteína.

Tabla 13. Resultados Curva de seroalbúmina bovina realizado por triplicado.

Concentración (ppm)	Promedio			Promedio	CV	STD
	Abs. curva 1	Abs. curva 2	Abs. curva 3	Abs.		
10	0,042	0,163	0,130	0,112	0,008	0,062
20	0,086	0,196	0,172	0,151	0,007	0,058
40	0,151	0,255	0,219	0,209	0,006	0,053
60	0,234	0,323	0,262	0,273	0,004	0,046
100	0,353	0,425	0,362	0,380	0,003	0,039
150	0,525	0,553	0,491	0,523	0,002	0,031
200	0,681	0,708	0,607	0,666	0,005	0,052
L1	---	---	---	0,416	$8,0 \times 10^{-6}$	$2,83 \times 10^{-3}$
L2	---	---	---	0,420		



**Figura 38.** Curva patrón de Seroalbúmina bovina.

La absorbancia para L1 y L2 corresponde a 0,416 y 0,420 equivalentes a una concentración de 111,724 y 113,0ppm de proteína respectivamente; estos resultados se resumen en la tabla 14, cada lavado (1500mL) se obtuvo del proceso de inmovilizar 15,656g de enzima lipasa equivalentes a 4,099g de proteína. Con las concentraciones calculadas de los lavados 1 y 2 se determinó la cantidad de proteína presente en estos, correspondiente a 0,167g y 0,170g lo que equivale a 0,638g y 0,647g de enzima *sin inmovilizar*, con este resultado se calculó por diferencia la cantidad de enzima inmovilizada en el soporte encontrándose valores correspondientes a 7,177g y 7,194g, es decir aproximadamente el 91,8% de enzima utilizada fue soportada en las PMRA (tabla 14).

**Tabla 14.** Resultados proceso de inmovilización enzimática

Lavado	Abs	ppm	Enz utilizada (g)	Proteína (g) lavados	Enz. (g) lavados	Enz.inm(g)
L1	0,416	111,724	7,815	0,167	0,638	7,177
L2	0,420	113,0	7,841	0,170	0,647	7,194

## 5.4 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL DE RICINO

### 5.4.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se expresó en términos de la velocidad, se calculó como la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Este parámetro se evaluó siguiendo las condiciones de reacción tanto del experimento A como B para el número 4 (ver metodología. Tabla 8 y 9). Estos experimentos se eligieron porque presentan unas menores condiciones de trabajo respecto al otro experimento, tales como, menor relación molar y menor temperatura de reacción, condiciones

consideradas a nivel industrial para la disminución de costos de producción, además de que permite evaluar las características básicas de la enzima LIPOZYME CALB producida del microorganismo *Aspergillus niger* que según los reportes presenta buena actividad catalítica en condiciones de reacción de temperaturas de 30-75°C y pH entre 5-9 [55].

La actividad enzimática evaluada fue expresada como mili-moles de ácido graso transesterificado por gramos de enzima utilizados, evaluados frente al tiempo de reacción, esto permitió establecer que la máxima cantidad de ácido graso transesterificado correspondió a 3,220 mili-moles con enzima libre en un tiempo de 85 minutos (figura 39), 3,260 mili-moles para enzima inmovilizada en un tiempo de 480 minutos (figura 40) y 3,001 mili-moles (figura 41) con enzima reutilizada en un tiempo de 300 minutos. Estos resultados establecen dadas las condiciones de reacción; temperatura de 30°C, relación molar etanol: aceite 2:1, carga enzimática del 0,05% (respecto al aceite) y un porcentaje de agua del 10%; que pese a que la máxima conversión se alcanza con la enzima inmovilizada en el soporte magnético, entra a competir la enzima libre en la reacción puesto que la máxima conversión se tiene sobre los 85 minutos, considerando el factor de producción con una diferencia de 0,431mili-mol de ácido graso transesterificado con uso de enzima libre vs inmovilizada, este ultimo valor puede atribuirse a que la enzima libre fue inhibida por el producto o por la concentración de ácidos grasos producidos en la reacción de hidrolisis que saturaron su centro activo. A nivel industrial el factor del tiempo es considerablemente importante pues a mayor tiempo de reacción se ven incrementados los costos de producción; es en este ámbito donde compite el tiempo de reacción vs la producción, considerando que la diferencia en cuanto al rendimiento no sea muy grande.

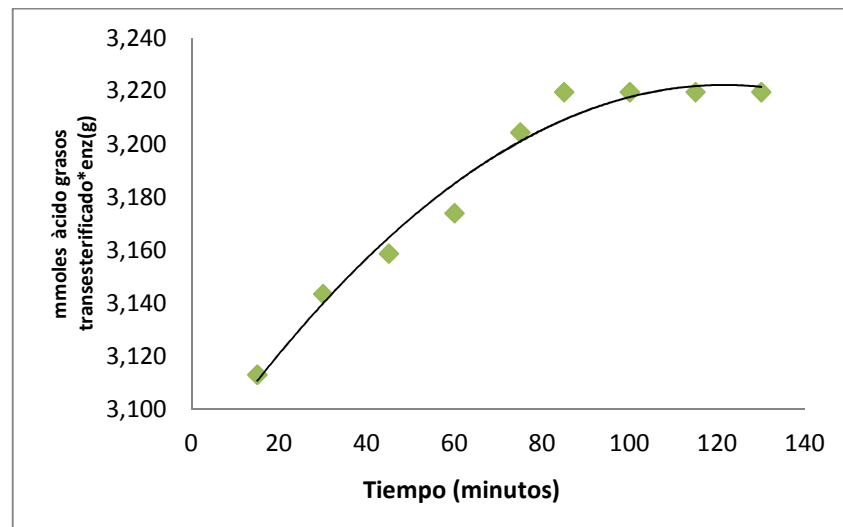
Los resultados anteriormente reportados se calcularon siguiendo la siguiente formula y los cuales se presentan en el anexo B.

$$\text{mmoles } T. \text{ trirricinoleína } \text{trasnesterificado} = \frac{(V_{KOH\ t=0} - V_{KOH\ t}) * N_{KOH} * FD * 1000}{Enz_g}$$

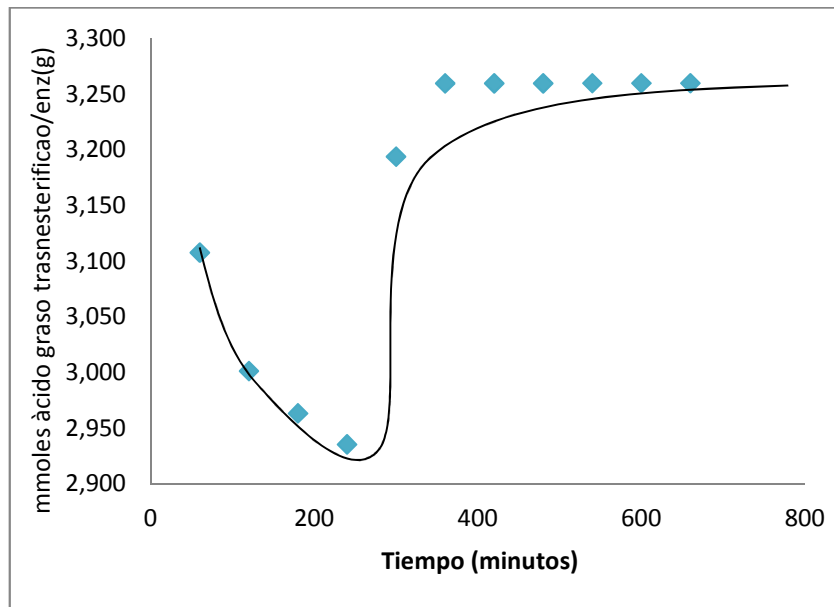
Otro aspecto importante de resaltar es que, tanto para la enzima libre, inmovilizada y reutilizada esta alcanza una velocidad máxima (máxima conversión/tiempo) que se hace constante, que como se explicó anteriormente puede verse atribuido a la saturación de la enzima o a su inhibición causada por el producto. La enzima reutilizada en un segundo ciclo catalítico presentó una disminución en la conversión del triglicérido a ésteres etílicos (biodiesel) lo cual establece que en cada proceso reactivo la enzima disminuye su actividad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la medición de la actividad enzimática para la enzima libre, inmovilizada y reutilizada. Al seguir la velocidad de aparición del producto en función del tiempo se obtuvo la llamada curva de avance de la reacción, o simplemente, la cinética

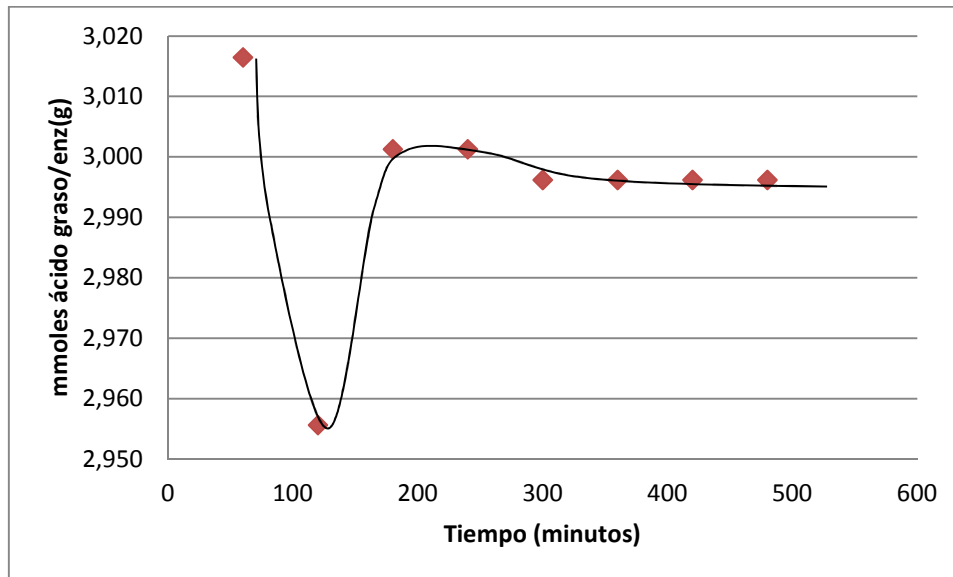
de la reacción, encontrándose que la transesterificación con enzima libre obedece la ecuación de Michaelis-Menten en la que se presenta una primera etapa de crecimiento de ácido ricinoléico transesterificado y una segunda etapa donde la velocidad se hace constante. Para el proceso de transformación del aceite utilizando enzima inmovilizada y reutilizada se presenta una cinética diferente que no obedece la ecuación de Michaelis-Menten, Se dice que su cinética no es Michaeliana. Según la figura 40 y 41 la cinética de dichas reacciones sigue el mecanismo Ping-pong según los reportes hechos por diferentes autores [56], los cuales explican que la actividad enzimática puede verse afectada por el proceso de inmovilización y por tanto la cinética cambia observando la fase de hidrólisis y la transesterificación. Las curvas de actividad enzimática con lipasa inmovilizada y reutilizada (figura 40 y 41) presentan 3 etapas: en la primera hay un incremento en la concentración de ácido graso ricinoléico producto de la hidrólisis enzimática, posterior a la hidrólisis se presenta una segunda etapa en la que hay una disminución de ácidos grasos libres que están siendo transesterificados generando por tanto la mezcla de etil ésteres correspondiente al biodiesel, finalmente hacia la última etapa se presenta un equilibrio de la reacción en la cual la velocidad de formación del biodiesel se hace constante.



**Figura 39.** Milimoles de ácido graso transesterificado por unidad de tiempo para la enzima LIPOZYME CALB libre.



**Figura 40.** Milimoles de ácido graso transesterificado por unidad de tiempo para la enzima LIPOZYME CALB inmovilizada.

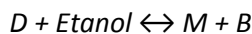


**Figura 41.** Milimoles de ácido graso transesterificado por unidad de tiempo para la enzima LIPOZYME CALB inmovilizada reutilizada.

#### 5.4.2 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE RICINO CON ÉTANOL

El Biodiesel es un biocombustible que se produce gracias a una reacción química denominada transesterificación o reacción descrita como hidrólisis alcalina; de modo general es la reacción entre un lípido con un alcohol, produciéndose un éster y un subproducto o glicerol ante la presencia de un catalizador, que bien puede ser un ácido ( $H_2SO_4$ ), una base (NaOH o KOH) o una enzima. En el presente trabajo se empleó como catalizador la enzima lipasa que catalizó de forma natural la hidrólisis del triacilglicérido trirricinoleína (88,86%) presente en el aceite de ricino, para dar monoacilglicéridos (M), diacilglicéridos (D), ácidos grasos libres y glicerol como se muestra abajo en la reacción general, que en presencia de etanol forma aparte de los productos ya mencionados una mezcla de etil-ésteres correspondientes al biodiesel (B).

##### Reacción General de transesterificación del triglicérido trirricinoleína

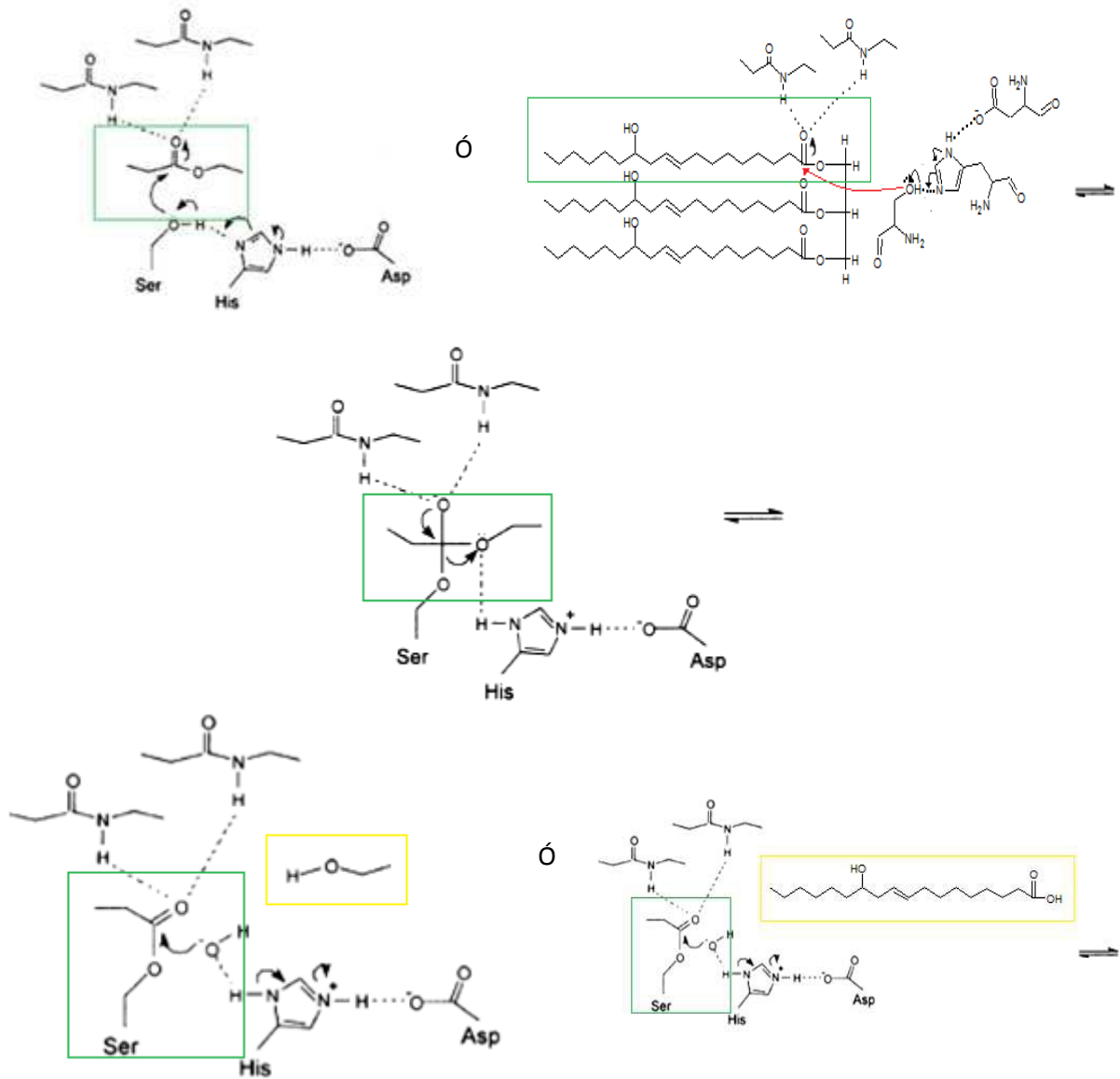


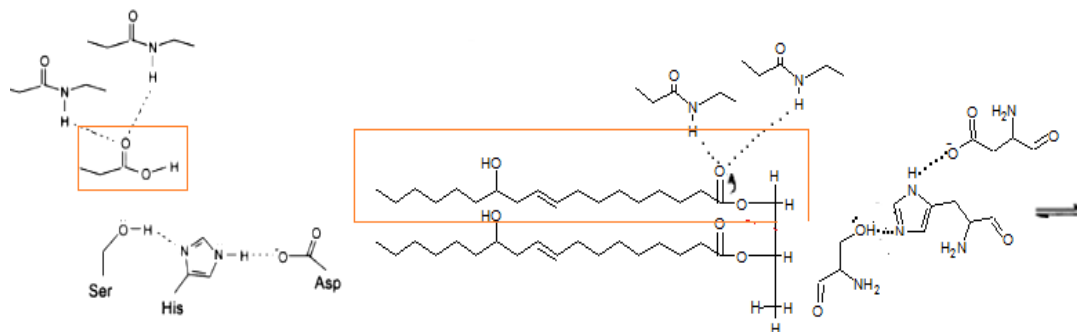
La reacción de transesterificación del aceite de ricino se llevo a cabo mediante dos experimentos (ver tabla 8 y 9 en metodología), donde se compara la calidad del Biodiesel obtenido con Lipasa libre e inmovilizada, con lo cual se espera que la enzima inmovilizada de un biodiesel de buena calidad según las especificaciones exigidas por la ASTM.

La reacción por vía enzimática ocurre primero con el reconocimiento del sitio activo de la lipasa, el cual se encuentra conformado por la tríada catalítica Ser-His-Asp/Glu [57], según la literatura consultada se cree que el mecanismo de la lipasa es similar al de las serina-proteasas. La reacción de transesterificación del triglicérido trirricinoleína en presencia de etanol empezaría con un ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre cualquiera de los carbonos del grupo carbonilo de los ácidos grasos del triglicérido (ácido Ricinoléico) susceptible de ser hidrolizado, con esto se forma un intermediario tetraedro caracterizado por la carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo que es estabilizado por hélices de la estructura de la lipasa y puentes de hidrógeno entre los grupos amino (NH) de residuos adyacentes formando lo que se denomina “la cavidad del oxianión” donde queda atrapada la cadena del ácido graso. Para ayudar a mejorar el ataque nucleofílico de la serina, el residuo de histidina catalítica recibe un protón del grupo hidroxilo de la serina para orientar el anillo imidazol de la misma y neutralizar parcialmente la carga que se desarrolla allí. Este mismo protón pasa al oxígeno del enlace éster que se separa del enlace tetraédrico obteniéndose el primer producto, es decir la liberación de un diglicérido más el ácido graso libre Ricinoléico. El ácido graso libre se vuelve a esterificar por medio del etanol presente en el medio formando un etil-éster (biodiesel), mientras que el diglicérido



termina por esterificarse con la serina, creando una enzima acilada. La desacilación comienza con el agua que entra al sitio activo y es activada por la histidina sacando un protón y dejando un ión OH que ataca nuevamente al átomo del grupo carbonilo ahora esterificado con la serina catalítica. De nuevo, un intermediario tetraédrico se forma y se estabiliza por las interacciones en la cavidad de oxianión. La histidina entonces dona el protón al átomo de oxígeno de la serina catalítica, haciendo que se libere el componente acilo. Una vez se libera el ácido formado, la enzima está lista para otro ciclo catalítico (ver figura 42) [57].





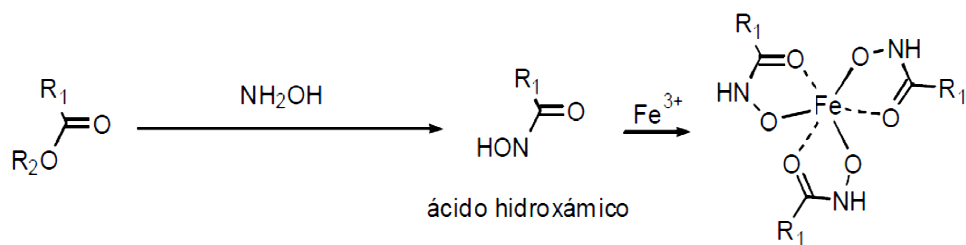
**Figura 42.** Mecanismo catalítico de la enzima Lipasa sobre el triglicérido trirricinoleína.

Según el mecanismo de reacción para la transesterificación descrito en la figura 42, y según las condiciones de trabajo elegidas (ver parágrafo 4.5.2) a medida que transcurría el tiempo, se formaban compuestos intermedios como los mono y diglicéridos, la formación de estos compuestos se evidenció de manera visual, al iniciar la reacción la viscosidad de la mezcla empezó a aumentar debido a la formación de una emulsión entre los productos de esta reacción con el etanol, a medida que aumentaba el tiempo de reacción la emulsión fue desapareciendo como consecuencia de la disminución en la concentración de los mono y diglicéridos, disminuyendo también dramáticamente la viscosidad. Esto se evidenció en la coloración inicial (blanca) de la solución reaccionante contra la coloración final (translúcida). Para corroborar esto se realizaron análisis adicionales explicados más adelante.

## 5.5 ANÁLISIS DEL BODIESEL

### 5.5.1 IDENTIFICACIÓN DE ÉSTERES

A cada producto de la reacción de transesterificación se realizó análisis de ésteres cualitativamente mediante la prueba de hidroxilamina, con el objetivo de establecer si la reacción llevada a cabo generó los ésteres etílicos (biodiesel) que se esperaban. Esta prueba consiste en la formación de ácidos hidroxámicos que producen una coloración rojiza o púrpura en presencia de iones férricos (ver figura 43), la desventaja del uso de esta prueba radica en que los ácidos grasos libres que quedan presentes en la reacción de transesterificación también arrojan un resultado positivo, lo que no permite concluir que la aparición del color rojizo corresponda exclusivamente a la formación del biodiesel en el proceso de transesterificación, por este motivo la identificación de ésteres se realizó de manera cualitativa usando esta técnica, recordemos que en el apartado 5.4.2 se explica la reacción paso a paso donde se ven involucrados a parte del biodiesel, los monoglicéridos y diglicéridos o posibles ácidos grasos libres sin transesterificar.



**Figura 43.** Reacción general de la prueba de hidroxilamina

En la figura 44 se muestra el resultado general para esta prueba, se especifica que este no presenta variación en ninguno de los experimentos planteados del proceso de transesterificación, las 24 muestras presentaron la misma coloración rojiza tal como se muestra en la imagen.

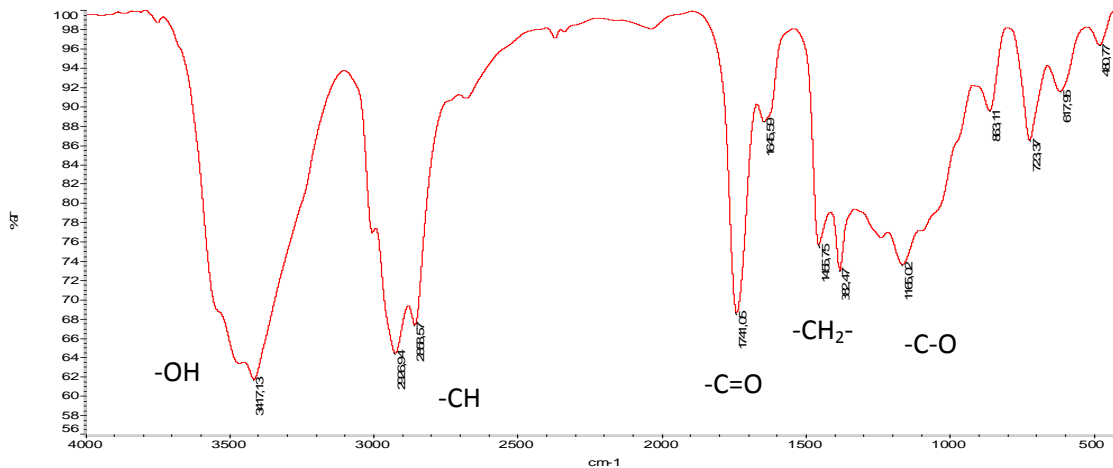


**Figura 44.** Resultado colorimétrico de la prueba de hidroxilamina para el triplicado del experimento 4B.

### 5.5.2 CARACTERIZACIÓN DEL BIODIESEL POR FT-IR

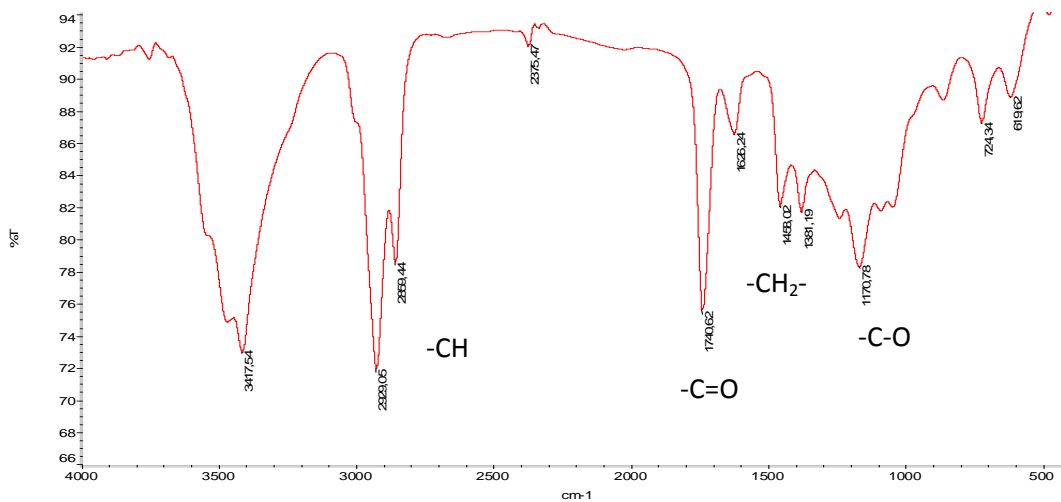
Como análisis adicional se reporta la caracterización del biodiesel obtenido en el experimento A y experimento B (ver párrafo 4.5.2) mediante espectrofotometría IR, eligiéndose una muestra al azar de cada triplicado llevado a cabo en el proceso de transesterificación del aceite de Ricino extraído.

En el espectro tomado para el aceite de ricino extraído (ver figura 45) se encontraron los siguientes resultados: Banda a  $3417.13\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo hidroxilo presente en el aceite y señal de mayor importancia dado a que es el único aceite vegetal que contiene este grupo. También se encuentran bandas características,  $C=O$  ( $1741.05\text{ cm}^{-1}$  éster),  $C=C$  ( $1645.59\text{ cm}^{-1}$ ),  $C-CH_3$  ( $1382.47\text{ cm}^{-1}$ ),  $C-O$  ( $1165.02\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro obtenido para este compuesto coincide con los reportados en la literatura y los que reposan en diferentes bases de datos de espectros [58].

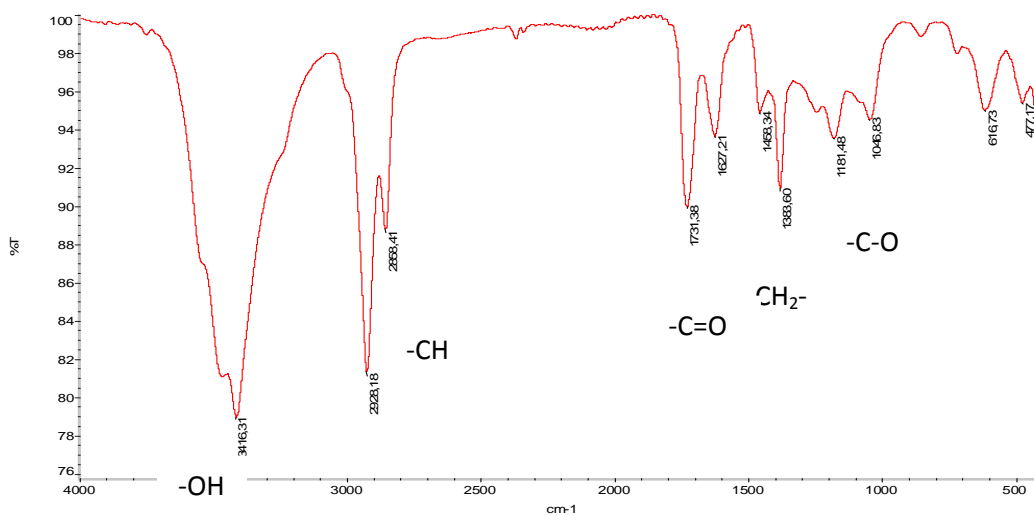


**Figura 45.** Espectro FT-IR (KBr) de Aceite de ricino extraído.

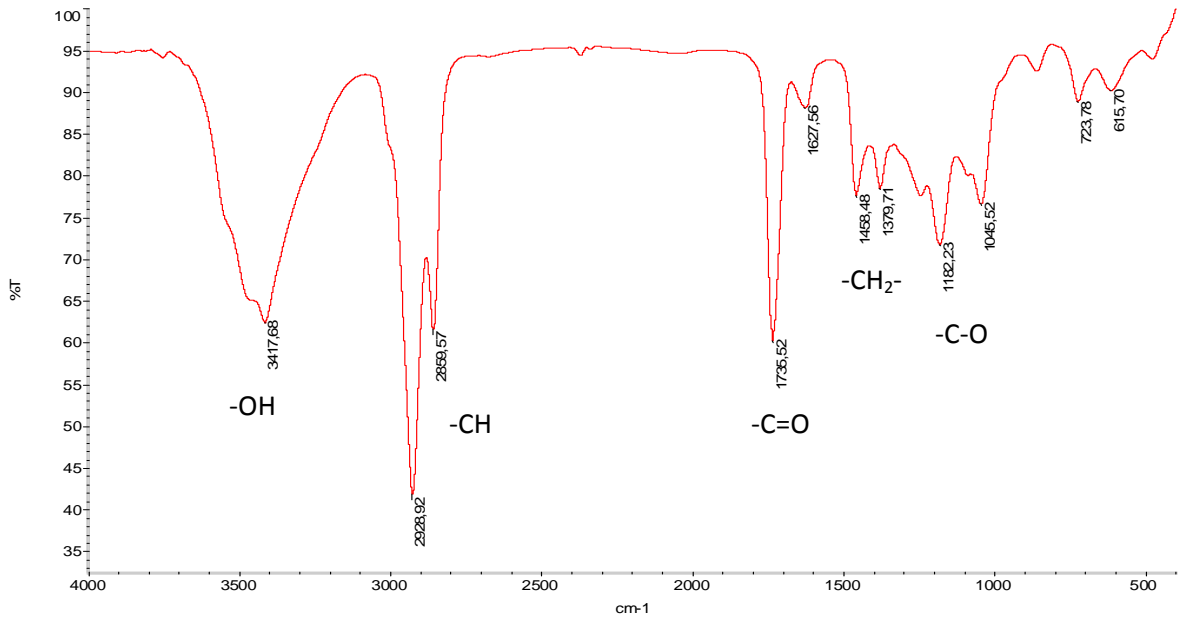
Para los espectros tomados para el biodiesel obtenido del aceite de ricino extraído (ver experimentos parágrafo 4.5.2) se evidencian las bandas asociadas a los ésteres, las bandas de enlaces C=O sobre los  $1740\text{ cm}^{-1}$ , C=O alrededor de los  $1100\text{ cm}^{-1}$  éster), las bandas que representan las cadena alifáticas entre  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ , y tal como se esperaba la banda característica de grupo hidroxilo (-OH) alrededor de los  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Realizando una comparación de los espectros tomados al biodiesel con el del aceite de ricino extraído (ver figura 45), se observa que para el biodiesel obtenido siguiendo las condiciones de reacción del experimento 4 hay una mayor intensidad en las bandas características (ver figura 48 y 49), siendo de menor intensidad para el biodiesel del experimento 3 (ver figuras 46 y 47). Entre el experimento A y B hay mayor intensidad de señales para el biodiesel obtenido en la transesterificación con enzima inmovilizada (experimento B). El aumento en la intensidad de la señales puede verse relacionado con la cantidad de glicerina y etanol presente en el biodiesel, debido a que pese a la purificación del biocombustible presentara un porcentaje bajo de estos alcoholes, lo cual sugiere una posible intensificación en las bandas. Estos resultados fueron corroborados en la literatura consultada en el que se encontraron diferencias solamente en las intensidades de las señales.



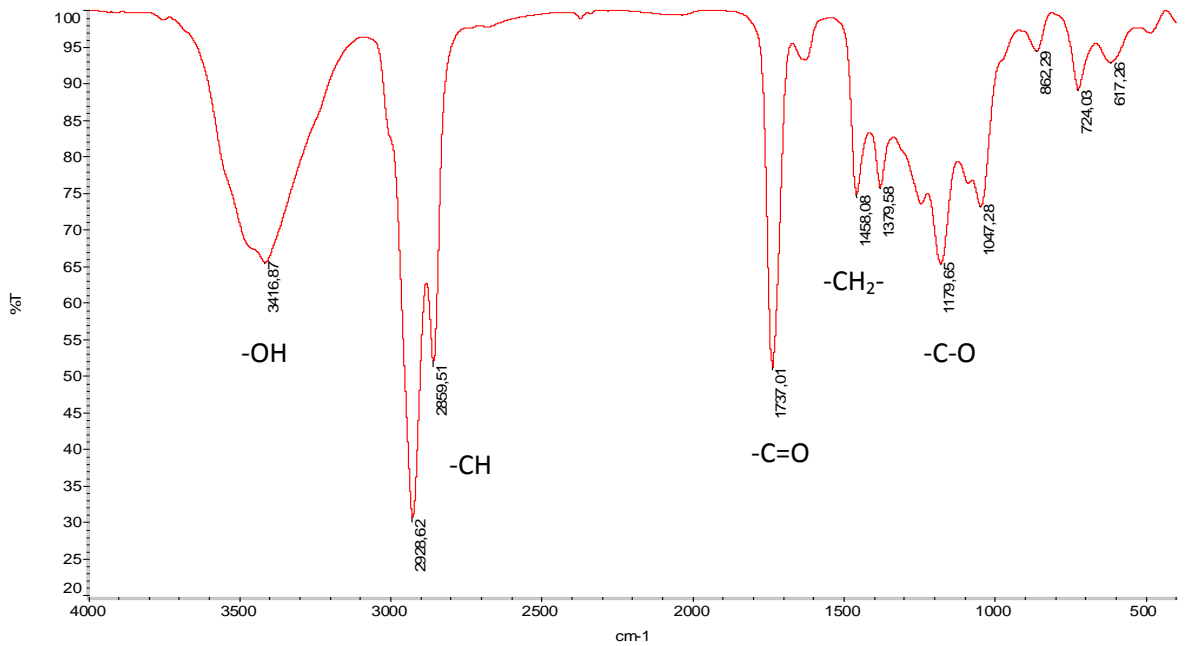
**Figura 46.** Espectro FT-IR (KBr) del Biodiesel obtenido del experimento 3A (Transesterificación con enzima inmovilizada).



**Figura 47.** Espectro FT-IR (KBr) del Biodiesel obtenido del experimento 3B (Transesterificación con enzima inmovilizada).



**Figura 48.** Espectro FT-IR (KBr) del Biodiesel obtenido del experimento 4A (Transesterificación con enzima inmovilizada).



**Figura 49.** Espectro FT-IR (KBr) del Biodiesel obtenido del experimento 4B (Transesterificación con enzima inmovilizada).

### 5.5.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Como se ha mencionado anteriormente, después de la reacción de transesterificación existen dos productos principales: glicerina y ésteres. Estos dos productos tienen densidades diferentes. Los Ésteres (biodiesel) tienen densidad del orden de 0,83 g/mL – 0,90, g/mL mientras que el glicerol tiene una densidad de orden de 1,05 g/mL o más. La densidad de la fase de glicerol depende de la cantidad de alcohol, agua y catalizador que contenga. Esta diferencia de densidad es suficiente para que las fases puedan ser separadas por gravedad a través de decantación y así poder realizar el análisis del biodiesel. Sin embargo hay que resaltar que dado a la presencia del grupo hidroxilo OH en los ésteres, estos se solubilizan en la glicerina y en el exceso de alcohol, por tanto para la separación de estas fases se suministró agua destilada a cada producto de reacción, este proceso se realizó por lo menos 5 veces hasta que la mezcla de ésteres se tornó más limpia y cristalina. El lavado se hace indispensable antes del análisis del biodiesel para remover los vestigios de catalizador, de jabón y de glicerol libre y ligado. Posteriormente al lavado se secó el biodiesel calentándolo lentamente hasta la evaporación del agua. Con el biodiesel limpio y seco se realizó el análisis físico y químico. Hay que recordar que los resultados provienen de la transesterificación por triplicado de los 4 experimentos tanto de A (transesterificación de aceite de higuera con enzima libre) como de B (transesterificación de aceite de higuera con enzima inmovilizada). En la tabla 16 se muestra el promedio de cada triplicado y su desviación estándar.

**Tabla 16.** Propiedades físicas y químicas del Biodiesel obtenido.

Muestra	Promedio	STD	Promedio	STD
<i>Densidad (g/mL) a 25 °C</i>			<i>Viscosidad a 40 °C (cSt)</i>	
1A	0,844	0,056	8,864	0,055
2A	0,780	0,021	18,993	0,030
3A	0,747	0,002	6,311	0,003
4A	0,769	0,003	8,281	0,005
1B	0,868	0,001	2,782	0,001
2B	0,882	0,001	15,428	0,008
3B	0,894	0,030	5,893	0,021
4B	0,873	0,002	7,448	0,003
<i>Índice de refracción a 25 °C</i>			<i>Punto de inflamación (°C)</i>	
1A	1,393	0,002	141,650	0,212
2A	1,450	0,067	142,950	1,202
3A	1,393	0,002	139,350	0,212
4A	1,416	0,007	150,450	0,465
1B	1,388	0,001	147,750	0,495
2B	1,380	0,006	144,700	0,566
3B	1,376	0,014	134,750	0,919
4B	1,392	0,001	148,950	0,354

<i>Destilación °C</i>			<i>Índice de Cetano</i>	
1A	302,500	2,121	83,00	1,412
2A	297,000	2,830	81,50	0,711
3A	299,000	1,413	86,00	1,412
4A	295,210	1,413	80,00	1,412
1B	299,500	2,122	74,00	0,002
2B	301,000	1,410	85,00	1,412
3B	294,500	0,712	84,00	1,412
4B	297,500	0,712	89,00	1,412
<i>Glicerina total %(m/m)</i>			<i>Glicerina libre %(m/m)</i>	
1A	0,198	0,005	0,015	0,001
2A	0,174	0,001	0,019	0,001
3A	0,190	0,031	0,010	0,001
4A	0,176	0,010	0,014	0,001
1B	0,180	0,006	0,011	0,001
2B	0,194	0,016	0,017	0,001
3B	0,201	0,016	0,019	0,002
4B	0,200	0,002	0,020	0,001
<i>Índice de yodo (g de I<sub>2</sub>/100 g aceite)</i>				
1A	75,650	0,354		
2A	74,550	0,354		
3A	72,700	0,424		
4A	66,150	0,354		
1B	72,400	0,141		
2B	74,200	0,141		
3B	75,950	0,212		
4B	74,450	0,071		

Evaluando los resultados de las propiedades físicas y químicas reportadas en la anterior tabla, se establece a continuación según la comparación con los valores reportados por las diferentes normas (ISO y ASTM) el experimento que permitió obtener un biodiesel de mejor calidad.

- **Densidad:** La densidad es un parámetro físico indispensable de análisis para un combustible, debido a que da una idea del contenido de energía de este. Las mayores densidades indican mayor energía térmica y una mayor economía de combustible. Teniendo en cuenta esto, los resultados de este parámetro indican que el biodiesel con mayor capacidad térmica es el que se obtuvo en la reacción de transesterificación con enzima inmovilizada, sus valores se encuentran en el rango de 0,86g/mL hasta 0,89g/mL, valores óptimos según los reportados por ISO 3675 EN ISO 12185 para combustibles (0,86g/mL- 0,90g/mL) [59]. El biodiesel de mayor densidad (0,8943 g/mL) se obtuvo del experimento 3 en el que se utilizó el aceite de higuera extraído en condiciones de



reacción de temperatura (35°C) y relación molar (3:1 etanol: aceite). La densidad del biodiesel obtenido en el proceso de transesterificación con enzima libre se encuentra por debajo del rango reportado por la norma.

- **Viscosidad:** La viscosidad es la resistencia que ofrecen las propias moléculas que forman un líquido al deslizarse entre sí. Es una propiedad que se pone de manifiesto cuando el líquido está en movimiento. Cuanto mayor es el grado de viscosidad de un líquido, significa que más grande es la resistencia interna que se opone a su fluir. Es independiente de la densidad pero dependiente de la temperatura [60]. La viscosidad de los combustibles es importante de considerar porque le da características de lubricidad al sistema de combustible, sin embargo debe ser mínima para evitar pérdida de potencia debida a las fugas en la bomba de inyección y en el inyector. Se debe limitar la viscosidad máxima por consideraciones de diseño y tamaño de los motores, además porque implica un consumo de energía mayor, al igual que un desgaste por falta de circulación lo cual conllevaría al calentamiento del combustible por fricción [65]. Según los resultados obtenidos, el biodiesel con menor viscosidad se obtuvo de la reacción de transesterificación con enzima inmovilizada, en comparación con el obtenido mediante vía enzimática libre; sin embargo según la norma ASTM D 445 y EN ISO 3104 para combustibles (1.9-6.0 cSt a 40°C), el único valor aceptable dentro del límite mínimo es el del biodiesel obtenido del experimento 1 (2,782 cSt a 40°C) y con valor cercano al límite máximo el biodiesel obtenido del experimento 3 (5,893 cSt a 40°C) (ambos experimentos presentan las mismas condiciones de reacción, aunque en el experimento 1 se usó aceite comercial y el experimento 3 aceite extraído) la diferencia de los resultados de esta propiedad puede atribuirse a posibles aditivos presentes en el aceite comercial logrando afectar por tanto este valor para el biodiesel. Según estos resultados el biodiesel obtenido por vía enzimática presenta mejores resultados, aunque el valor mínimo de viscosidad lo haya presentado el aceite comercial y no el de estudio.
- **Índice de refracción:** Para los resultados obtenidos para este análisis no se tienen patrones cualitativos de comparación, ya que no se encontraron reportes específicos sobre el tema. Tampoco se conoce de normas vigentes para este tipo de biocombustible que regulen la caracterización físico-química por índice de refracción realizada. Sin embargo puede servir como criterio de caracterización, para compararlo con el biodiesel que se obtiene de otras fuentes vegetales o animales, o con otros procedimientos de obtención. Cabe resaltar que el biodiesel en comparación con el aceite puro (1,4729) muestra una disminución en este parámetro, sin embargo no es un factor que influya en la calidad del biocombustible pero indica cambios en la composición entre el material de partida y el producto.

## 7. RECOMENDACIONES

- Identificar el ecotipo al cual pertenece la semilla de higuera cultivada en el municipio del Tambo, departamento del Cauca, comparando los resultados obtenidos en éste estudio y las investigaciones realizadas anteriormente con ésta especie.
- Plantear un diseño experimental más amplio para la evaluación de la actividad enzimática y así determinar las condiciones óptimas para la producción de Biodiesel mediante la enzima LIPOZYME CALB libre e inmovilizada en el soporte magnético.
- Realizar una caracterización estructural del soporte magnético mediante Microscopía electrónica TEM y SEM, difracción de rayos X, espectroscopia Mossbauer, medición de la susceptibilidad magnética.

## BIBLIOGRAFÍA

- 
- [1] Sila Science, Trabzon, Turkey. Progress and recent trends in biodiesel fuels. Journal Energy Conversion and Management. February 2008. Vol 50. P. 14-34.
- [2] Knothe, G. The Use of Vegetable Oils and Their Derivatives as Alternative Diesel Fuels Oil Chemical Research, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL 61604. 2009.(G, 2009).
- [3] Benavides A., Benjumea P., Pashova V. El biodiesel de aceite de higuera como combustible alternativo para motores diesel. Universidad Nacional de Colombia Medellín., Red de revistas científicas de América latina y el Caribe, España y Portugal Redalyc. Noviembre, 2007. vol.74 número 153.
- [4] Goering, C. E. et al. Fuel properties of eleven vegetable oils. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers (ASAE). Vol. 25. 1982. P.1472 – 1483.
- [5] R Lizana D. Antecedentes Generales sobre Biodiesel [En línea]. –Biblioteca nacional de Chile, 2007. – 15 junio de 2011.  
[http://www.ecodesarrollo.cl/descargas/Antecedentes\\_Biodiesel\\_D.pdf](http://www.ecodesarrollo.cl/descargas/Antecedentes_Biodiesel_D.pdf)
- [6] Dussan, M. K. Inmovilización de enzimas en Nanoestructuras magnéticas para aplicaciones industriales. Tesis en maestría en ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales Págs. 124. Mayo 2008.
- [7] Borges M.E., Díaz L., Álvarez M.C. High performance heterogeneous catalyst for biodiesel production from vegetal and waste oil at low temperatura. Journal Catalysis B: environmental. October 2011. Vol 102. p. 310–315
- [8] Franco Germán., Navas Alejandro., Bermúdez Adiel. Red de investigación participativa en el cultivo de la higuera (*ricinus communis l.*), en Colombia. Proyecto: Evaluación de ambientes y materiales de higuera para la producción de aceite y biodiesel. Corpoica 2011
- [9] Proaño M, P. Investigación de la utilización del aceite de Higuera como combustible alternativo al 5-10% en motores diesel con bomba de alta presión convencional. Proyecto de grado Ingeniería Automotriz. Latacunga, Junio 2010.
- [10] Severino Liv S., Gondim T M. Curso sobre el cultivo de Higuera. Investigación de EMBRAPA-BRASIL. Octubre 2005.

---

**[11]** Alvarado L Daniel. Caracterización morfométrica de cinco ecotipos de higuierilla (*Ricinus communis*) en la ESPOL. Trabajo de grado Ingeniería agropecuaria. Guayaquil-Ecuador 2009.

**[12]** Chile flora fuente de semillas [En línea].

–Biblioteca nacional de Chile, 2007. – 15 junio de 2011.

<http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH0558.htm>

**[13]** Agroindustria: Higuierilla, cultivos, recolección y extracción (AHR aceite ricinol). [En línea].

-Emprendimiento agroindustrial de Higuierilla, 2011. – 15 junio de 2011.

<http://agroindustria.com/higuierillaahr/agroindustria.html>

**[14]** Recalde P E., Altisent J. Moraima M A. Cultivos energéticos alternativos: Caracterización bromatológica de semillas de tres especies de oleaginosas (girasol, higuierilla y chíá). CIITOL Centro Iberoamericano de investigación y transferencia de tecnología en oleaginosas 2009. P. 89-98.

**[15]** Valderrama J., Aravena F. Libro: La higuierilla y su principal producto, el aceite de ricino. Parte 1 aspectos generales. La Serena Chile. Información tecnológica vol. 5 N°1 1994. P. 87-91.

**[16]** Perea-Flores M.J., Chanona-Pérez J.J, V. Garibay-Febles, G. Calderón-Dominguez,. Terrés-Rojas, J.A. Mendoza-Pérez, R. Herrera-Bucio. Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (*Ricinus communis*). Industrial Crops and Products, vol 34, July 2011. P.1057-1065.

**[17]** Flesch. F. Intoxicaciones de origen vegetal. EMC - Tratado de Medicina, vol. 10, 2006. P. 1-11

**[18]** Perdomo Felipe A., Acosta-Osorio Andrés A., Herrera G., Vasco-Leal José F, Mosquera-Artamonov José D., Millan-Malo Beatriz., Rodríguez-García Mario E. Physicochemical characterization of seven Mexican *Ricinus communis* L. seeds & oil contents. Journal Biomass and Bioenergy, vol. 48, January 2013. P. 17-24.

**[19]** Publicaciones de las naciones unidas. Producción y elaboración del aceite de Ricino. Organización de las naciones unidas para el desarrollo industrial. New york 1974.

**[20]** Manzano P., Rivera P., Pérez J., Orellana A., Ahumada O., Castillo J., Ruiz O. Comparación del porcentaje de aceite y del tamaño de seis ecotipos de semillas de higuierilla (*Ricinus communis*), de origen sudamericano. Revista Tecnología ESPOL-RTE, vol. 22, N.1, 15-20 septiembre 2009.

**[21]** Benavides A., Benjumea P., Pashova V. El biodiesel de aceite de higuierilla como combustible alternativo para motores diesel. DYNA vol. 74. Medellín Colombia. Noviembre 2007.

---

[22] Red estrategia BIODISOL. Biodisol [En línea] 10 de Diciembre de 2012. - <http://www.biodisol.com/que-son-las-energias-renovables-clasificacion-evolucion-historica-las-fuentes-de-energias-renovables/>.

[23] Montoya A J. Modelamiento y simulación de la cinética de transesterificación del aceite de ricino con alcohol etílico, catalizada con NaOH. Febrero 2009 Medellín-Colombia.

[24] Atabani A.E., Silitonga A.S., Badruddin Irfan Anjum, Mahlia T.M.I., Masjuki H.H., Mekhilef S. Review Article. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, May 2012. P. 2070-2093.

[25] Dirección de ahorro de energía en el transporte. CONAE. Biodiesel. Diciembre 2007. Versión pdf.

[26] Red estrategia BIODISOL. Biodisol [En línea] 10 de Diciembre de 2012. <http://www.biodisol.com/biodiesel-que-es-el-biodiesel-definicion-de-biodiesel-materias-primas-mas-comunes/la-produccion-de-biodiesel-materias-primas-procesos-calidad/>

[27] Ciria Ignacio. WEARCHECK IBERICA. Propiedades y características de combustibles diesel y biodiesel. 12 de diciembre 2012

[28] Red estrategia Ambisol. Ambisol: Normas de calidad del Biodiesel. [En línea]. 2 enero de 2013.- <http://www.ambisol.es/index.php?Tema=detallen&id=418>

[29] Alarcón Manuel. Tesis de Maestría. Producción de la Lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis. Universidad Autónoma de Barcelona., Bellaterra, Junio de 2008.

[30] Arroyo Miguel. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. Universidad Complutense de Madrid. School of Biochemistry and Molecular Biology. *Ars Pharmaceutica*, 1998. P. 1-17

[31] Román Miguel. Tesis de doctorado. Hidrolisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes. Universidad de Granada. Granada 2005.

[32] Sharma Rohit., Chisti Yusuf., Banerjee Uttam Chand. *Journal Biotechnology Advances*. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Vol 19, N°8, December 2001. P. 627-662.*

[33] Cowan Don A., Fernandez-Lafuente Roberto. *Journal Enzyme and Microbial Technology*. Review: Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. vol 49, N°4, 10 September 2011, P 326-346.

---

**[34]** Cerón L. Magnetismo de rocas y minerales. Estudio mineralógico de suelos agrícolas por espectroscopia Mössbauer [En línea] Diciembre 12 de 2012.  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/cer%C3%B3n\\_l\\_m/cap3.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/cer%C3%B3n_l_m/cap3.pdf).

**[35]** Villachica L Carlos., Llamosas B Jaime., Villachica L Leslye. Oro ecológico Tecnología para la obtención de oro sin mercurio en la minería de pequeña escala. Smallvill S.A.C-Consulcont S.A.C [En línea] Diciembre 12 de 2012.  
<http://www.minam.gob.pe/mn-ilegal/images/files/oroecologico.pdf>

**[36]** Association of official analytical chemists. Determination of Ash Content. En: Official Methods of Analysis. AOAC 920.153. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[37]** \_\_\_\_\_. *Determination of moisture* content. En: Official Methods of Analysis. AOAC 950.43. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[38]** \_\_\_\_\_. *Fat in Feeds*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 991.36. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005

**[39]** \_\_\_\_\_. *Determination of the nitrogen content*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 968.06. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[40]** \_\_\_\_\_. *Crude Fiber Analysis*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 962.09. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[41]** \_\_\_\_\_. *Specific Gravity (Apparent) of Oils Pycnometer Method*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 920.212. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[42]** \_\_\_\_\_. *Index of Refraction of Oils and Fats*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 921.08. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[43]** Hoekman S. Kent, Broch Amber, Robbins Curtis, Cenicerros Eric, Natarajan Mani. Journal Renewable and Sustainable Energy Reviews. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. vol 16, N° 1, January 2012, P. 143-169.

**[44]** \_\_\_\_\_. *Iodine Absorption Number of Oils and Fats*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 920.159. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

**[45]** \_\_\_\_\_. *Saponification value*. En: Official Methods of Analysis. AOAC 920.160. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

---

[46] American oil chemists' society. Fatty Acid Composition by GC: *cis*, *cis* and *trans* isomers. En: Official Methods and Recommended Practices. AOCS Ce 1C – 89. 6<sup>th</sup> ed. Urbana, Illinois: The association, 2009.

[47] Borgesa M.E., Diaz L., Alvarez-Galvanb M.C., Britoa A. Journal. Applied catalysis B: Environmental. High performance heterogeneous catalyst for biodiesel production from vegetal and waste oil at low temperature. Vol. 102. October 2011. P. 310-315.

[48] Dorado P María. Tesis Doctoral “Desarrollo y ensayo de nuevos biocombustibles para motores diesel procedentes de diversas semillas oleaginosas y de grasas vegetales usadas”. Universidad de Córdoba España 2001.

[49] BERNAL, I. Sustancias Grasas. En: Análisis de alimentos. Bogotá D.C.: Editora Guadalupe, 1993. p. 125-168

[50] Navarro R (1997) Derivados de aceite de girasol como biocarburantes. Tecnoambiente: 103–105.

[51] Benjumea P., Agudelo J., Rios L. Biodiesel: producción, calidad y caracterización. Universidad de Antioquia. Diciembre 2009. Pág. 16. [En línea] Diciembre 20 de 2012.  
[http://books.google.com.co/books?id=yiaApKhNqRYC&pg=PA15&dq=perfil+de+acidos++grasos+aceite+ricino&hl=es419&sa=X&ei=Bj\\_oUKrACo3i8gSk8oDQAw&ved=0CEoQ6AEwBQ#v=onepage&q=perfil%20de%20acidos%20%20grasos%20aceite%20ricino&f=false](http://books.google.com.co/books?id=yiaApKhNqRYC&pg=PA15&dq=perfil+de+acidos++grasos+aceite+ricino&hl=es419&sa=X&ei=Bj_oUKrACo3i8gSk8oDQAw&ved=0CEoQ6AEwBQ#v=onepage&q=perfil%20de%20acidos%20%20grasos%20aceite%20ricino&f=false)

[52] Coneição, P; Candeia, R. 2007. Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos. Brasil. Tesis Ingeniero Químico. Universidade Federal de Mato Grosso. 105p.

[53] Huang, S.H., Liao, M.H., and Chen, D.H., Direct binding and characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles. Biotechnology progress, 2003. 19(3), p. 1095-1100.

[54] Gunde, M.K., Vibrational modes in amorphous silicon dioxide. Physica B: Condensed Matter. 2000. 292 (3-4), p. 286-295

[55] Coca, Janny., Hernandez S., Martinez S., Berrío Rachel. Caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*. Grupo de biotecnología CIPRO., Fac Ingeniería química.,C. Habana Cuba.

[56] Houssam El Rassy, Perrard Alain, Pierre Alain C.. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30 (2004) 137–150.

---

**[57]** K.-E. Jaeger, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, Annual Review of Microbiology, 53 (1999) 315-351.

**[58]** Valero Manuel., Pulido Jorge E., Ramírez Alvaro, Cheng Zhengdong. Estudio de las propiedades mecánicas, térmicas, reológicas y morfología de poliuretanos a partir de aceite de higuera modificado por transesterificación. Revista Iberoamericana de polímero Valero et als. Volumen 9 (2) marzo 2008. Propiedades del poliuretano.

**[59]** Biodiesel: especificaciones ASTM. [en línea] 8 enero 2013.  
<http://www.biodisol.com/biodiesel-que-es-el-biodiesel-definicion-de-biodiesel-materias-primas-mas-comunes/biodiesel-especificaciones-astm-normas-de-calidad-del-biodiesel/>



## ANEXOS

### ANEXO A. Fotografías del análisis proximal de la semilla Higuierilla.

**Figura 50.** Estufa empleada para la determinación de humedad



**Figura 53.** Digestión de la muestra para la determinación de proteína por el método Kjeldahl



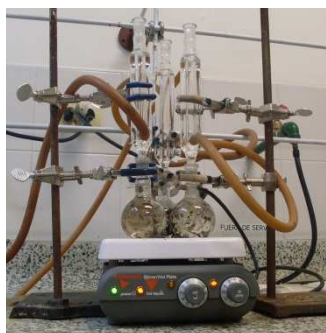
**Figura 51.** Mufla empleada para la determinación de cenizas



**Figura 54.** Extracción de la grasa de la muestra en el equipo soxhlet



**Figura 52.** Digestión de la muestra para la determinación de fibra bruta



**Figura 55.** Coloración del indicador de Tashirol en solución ácida

