



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“Síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite
de la semilla del Árbol del Hule (*Hevea brasiliensis*)
asistida por ultrasonido y microondas”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Roberto Eder González Cruz

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. Yenise Ramírez Reyes



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MAYO 2024



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, 21/mayo/2024
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación
Asunto: Autorización de Impresión
OPCION: I

C. Roberto Eder González Cruz
Candidato(a) a Grado de Maestro en:
Ciencias en Ingeniería Química
P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros e Institutos Tecnológicos Federales del Tecnológico Nacional de México, de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

" Síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite de la semilla del Árbol del Hule (*Hevea brasiliensis*) asistida por ultrasonido y microondas".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

Dra. Ofelia Landeta Escamilla
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



OG-13-F06



Av. Oriente 9 Núm.852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320 Orizaba, Veracruz.
Tel. 01 (272)1105360 e-mail: dir_orizaba@tecnm.mx tecnm.mx | orizaba.tecnm.mx





Orizaba, Veracruz, **19/octubre/2023**
Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

ROBERTO EDER GONZÁLEZ CRUZ

La cual lleva el título de:

"Síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite de la semilla del árbol del hule (*hevea brasiliensis*) asistida por ultrasonido y microondas."

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

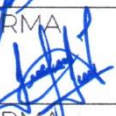
PRESIDENTE: DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO


FIRMA

SECRETARIO: MC. YENISE RAMÍREZ REYES


FIRMA

VOCAL: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA


FIRMA

VOCAL SUP.: DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS


FIRMA

TA-09-18



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 21 del mes de Mayo del año 2024.

El(la) que suscribe

C. Roberto Eder González Cruz

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 94 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

“Síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite de la semilla del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) asistida por ultrasonido y microondas”

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del (la) M.C. Yenise Ramírez Reyes y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

Roberto Eder González Cruz

DEDICATORIAS

A Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida, por ser mi fortaleza, darme siempre salud, paciencia y brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A mi madre Guadalupe, por ser un pilar muy importante en mi vida, porque siempre he podido contar con su apoyo en todo momento, darme su amor para hacerme más fuerte. Agradezco por cada sacrificio que hizo pensando siempre en brindarme la oportunidad de estudiar una carrera e inculcarme la importancia del trabajo duro.

A mi padre Roberto, por haberme brindado su inmenso amor y apoyo durante el transcurso de mi vida.

A madre Martha, quien siempre estuvo a mi lado para darme una voz de aliento y de cariño; por haberme motivado siempre a continuar con mis estudios y por ser la principal razón por la cual decidí realizar mis estudios de maestría.

A mi hermana Abigail, quien me brinda su apoyo y comprensión, solo puedo decirle que siempre estaré cuando me necesite.

A mis amigos por confiar en mí: **Selma, Iris y Anahí**, que no solo me acompañaron en los buenos momentos de mi carrera, sino también en aquellos momentos en los que necesite de su apoyo.

RECONOCIMIENTOS

A mis profesores **M.C. Gabriel Ríos Cortez** y **M.C. Yenise Ramírez Reyes** les agradezco la confianza y aceptación otorgada al ser parte importante en la realización de este proyecto. Agradezco la oportunidad de compartir conmigo sus conocimientos desde el periodo de residencias; así como, su apoyo para cubrir necesidades presentadas a lo largo del proyecto logrando buenos resultados y adquiriendo una buena formación en el uso y buen trabajo de equipos dentro del laboratorio.

A la **Dra. Ofelia Landeta Escamilla**, **Dr. Eusebio Bolaños Reynoso**, **Dra. Leticia López Zamora** y **Dr. Juan Manuel Méndez Contreras** por su apoyo y dedicación en la culminación de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca con número de registro 851365, para poder lograr este grado académico.

RESUMEN

“Síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite de la semilla del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) asistida por ultrasonido y microondas”

Elaborado por: Ing. Roberto Eder González Cruz

Dirigida por: M.C. Yenise Ramírez Reyes

En la síntesis de biodiesel existen factores que influyen directamente en su obtención, como son la materia prima y el método de producción, teniendo métodos que disponen residuos finales tóxicos y métodos que utilizan la química verde. El objetivo fue evaluar el efecto del método de asistencia por ultrasonido y microondas en la síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite de las semillas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*). Se realizó el secado de las semillas para determinar el porcentaje de materia seca (61.75 %) y el porcentaje de humedad (38.25 %) presentes en la semilla. La materia seca obtenida se sometió a extracción de aceite por medio del método Soxhlet empleando n-hexano como disolvente, comparando el rendimiento de aceite crudo siendo de 31.02 % y aceite refinado de 25.32 % disminuyendo un 18.38 % durante el proceso de purificación. Dicho aceite se analizó mediante las NOM y su composición mediante CG. Posteriormente, se sometió a transesterificación comparando el rendimiento obtenido por ambos métodos, utilizando como aceptor de acilo el metanol y como medio catalizador la lipasa *Candida antártica B* (CAL B). En las síntesis del biodiesel obtenido por una reacción de transesterificación utilizando aceite refinado extraído de las semillas del árbol del hule se encontró que el mejor rendimiento en ambos métodos de asistencia se presentó en el experimento número 6. El experimento se realizó utilizando 0.1 g de lipasa (CAL B) con 4 g de metanol a una temperatura de 50 °C, la diferencia radica en el tiempo de reacción siendo de 60 min por irradiación con ultrasonido y 30 min por el método de microondas. La cinética realizada para ambos experimentos bajo las condiciones anteriores, demuestra que con una energía de activación menor el método de asistencia por microondas tiene una mejor capacidad de introducir la energía de forma más eficiente a la reacción y a la mitad de tiempo.

ABSTRACT

"Enzymatic synthesis of biodiesel from oil from the seed of the rubber tree
(*Hevea brasiliensis*) assisted by ultrasound and microwave"

By: Ing. Roberto Eder González Cruz

Advisor: M.C. Yenise Ramírez Reyes

In the synthesis of biodiesel there are factors that directly influence its obtaining, such as the raw material and the production method, having methods that dispose of toxic final waste and methods that use green chemistry. The objective was to evaluate the effect of the ultrasound and microwave assistance method on the enzymatic synthesis of biodiesel from the oil of the seeds of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). The seeds were dried to determine the percentage of dry matter (61.75%) and the percentage of moisture (38.25%) present in the seed. The dry matter obtained was subjected to oil extraction by means of the Soxhlet method using n-hexane as a solvent, comparing the yield of crude oil being 31.02% and refined oil 25.32%, decreasing by 18.38% during the purification process. Said oil was analyzed by NOM and its composition by GC. Subsequently, it was subjected to transesterification, comparing the yield obtained by both methods, using methanol as the acyl acceptor and the lipase *Candida antarctica* B (CAL B) as the catalyst medium. In the syntheses of biodiesel obtained by a transesterification reaction using refined oil extracted from the seeds of the rubber tree, it was found that the best performance in both assistance methods was presented in experiment number 6. The experiment was carried out using 0.1 g of lipase (CAL B) with 4 g of methanol at a temperature of 50 °C, the difference lies in the reaction time being 60 min for ultrasound irradiation and 30 min for the microwave method. The kinetics carried out for both experiments under the previous conditions demonstrate that with a lower activation energy the microwave assisted method has a better capacity to introduce energy more efficiently into the reaction and in half the time.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Árbol del hule (<i>Hevea brasiliensis</i>)	8
1.2.1 Características generales	8
1.2.2 Descripción de las características de la semilla	9
1.2.3 Cultivo en México	9
1.2.4 Aprovechamiento	10
1.2.5 Estudios previos en la composición	11
1.3 Aceite	13
1.3.1 Generalidades	13
1.3.2 Composición	13
1.3.3 Clasificación	14
1.3.4 Usos	15
1.3.5 Extracción	15
1.3.6 Refinación	16
1.4 Enzimas	17
1.4.1 Reacción enzimática	18
1.4.2 Lipasa <i>Candida antártica</i> (CAL)	19
1.5 Bioenergía	21
1.5.1 Biocombustibles	21
1.5.2 Biomasa	21
1.5.3 Clasificación de los biocombustibles	21

1.5.4 Biodiesel	22
1.6 Procesos de producción de biodiesel	29
1.6.1 Tecnologías verdes para la producción de biodiesel	29
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 Materia prima	35
2.2 Caracterización de la semilla	35
2.3 Análisis de la materia prima	35
2.3.1 Curva de secado	35
2.3.2 Contenido de humedad y rendimiento de materia seca	35
2.4 Preparación de la materia prima	36
2.5 Humedad restante	37
2.6 Extracción del aceite	37
2.7 Limpieza del aceite	37
2.7.1 Recuperación del solvente	38
2.8 Refinación del aceite	38
2.8.1 Desgomado ácido	38
2.8.2 Desgomado acuoso	39
2.8.3 Neutralización	39
2.9 Caracterización físico-química del aceite	40
2.10 Obtención del biodiesel	41
2.10.1 Reacción de transesterificación	41
2.10.2 Separación	42
2.10.3 Purificación	42
2.11 Evaluación del rendimiento del biodiesel	42
2.11.1 Curvas patrón	42

2.11.2	Perfil de metilésteres	43
2.12	Análisis y determinación de parámetros cinéticos	44
2.12.1	Cinética de reacción	44
2.12.2	Cálculo de energía de activación de la reacción	45
CAPÍTULO 3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1	Caracterización de la semilla	48
3.1.1	Forma y tamaño	48
3.1.2	Curva de secado y humedad restante	49
3.1.3	Rendimiento de materia seca	50
3.2	Extracción de aceite	51
3.2.1	Caracterización de aceite	52
3.3	Rendimiento de Metilésteres	54
3.3.1	Determinación del contenido de AG	54
3.3.2	Determinación del contenido de metilésteres	56
3.3.3	Análisis del rendimiento de metilésteres	58
3.4	Calculo de la energía de activación	70
3.4.1	Reacción de transesterificación asistida por Microondas	71
3.4.2	Reacción de transesterificación asistida por Ultrasonido	75
3.5	Discusión de resultados	77
CONCLUSIONES		80
RECOMENDACIONES		83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		84
ANEXOS		90
Anexo A.	RESULTADOS	91
B.1	MICROONDAS	91
B.2	ULTRASONIDO	93

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Principales estados con superficie sembrada de <i>Hevea brasiliensis</i> en la República Mexicana (Aguirre y Santoyo, 2013)	10
1.2. Tipos de biocatalizadores.	18
1.3. Diferencia de energía que necesita una reacción no catalizada (línea más gruesa) y la misma reacción con catálisis enzimática. (Lodeiro, 2015)	19
1.4. Representación de las isoenzimas de <i>Candida antártica</i> : a) CAL A, b) CAL B (RCSB PDB, 2016)	20
1.5. Método general de obtención de biodiesel	25
1.6. Reacciones reversibles consecutivas en la transesterificación	26
2.1. Metodología general	34
3.1. Lugar de recolección de las semillas de <i>Hevea brasiliensis</i> , Laguna chica, Tezonapa, Veracruz	48
3.2. Tamaño de la semilla del árbol del hule (<i>Hevea brasiliensis</i>)	49
3.3. Porcentaje de humedad restante contenido en las semillas de <i>Hevea brasiliensis</i>	50
3.4. Comparación de los porcentajes de materia seca y humedad presentes en las muestras de semilla	51
3.5. Porcentajes de materia grasa (MG) a diferentes tiempos de extracción y una temperatura de 69 °C	51
3.6. Comparación del rendimiento de materia grasa	52
3.7. Cromatograma e identificación de AG en el aceite de <i>Hevea brasiliensis</i>	55
3.8. Curvas patrón para los ácido palmítico, esteárico y oleico	57
3.9. Curvas patrón para los metil palmitato, estearato y oleato	58
3.10. Cromatograma del experimento 6	60
3.11. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de metilésteres utilizando microondas	61
3.12. Gráfica Mitad-Normal para el rendimiento por metilésteres	62

3.13. Gráfico de superficie de respuesta estimada por el método de microondas	63
3.14. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta por el método de microondas	63
3.15. Cromatograma del experimento 6	66
3.16. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de metilésteres utilizando ultrasonido	67
3.17. Gráfica Mitad-Normal para el rendimiento por metilésteres	68
3.18. Gráfico de superficie de respuesta estimada por el método de ultrasonido	69
3.19. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta por el método de ultrasonido	69
3.20. Ajuste de reacción a ecuación de orden 2	73
3.21. Ajuste de constantes de velocidad a la recta	74
3.22. Ajuste de reacción a ecuación de orden 2	76
3.23. Ajuste de constantes de velocidad a la recta	77

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1. Características taxonómicas de <i>Hevea brasiliensis</i>	8
1.2. Principales estados de la República Mexicana con producción de <i>Hevea brasiliensis</i> (SIAP, 2016)	10
1.3. Perfil de AG presentes en el aceite de las semillas de <i>Hevea brasiliensis</i>	11
1.4. Propiedades de los ésteres metílicos del biodiesel obtenido a partir del aceite de semilla de <i>Hevea brasiliensis</i> en comparación con el diésel estándar	12
1.5. Características de las isoformas de la lipasa CAL	20
1.6. Clasificación de los biocombustibles	22
2.1. Análisis para control de la calidad del aceite	40
2.2. Factores y niveles del diseño experimental	41
2.3. Ecuaciones de velocidad integradas	45
2.4. Ecuación de Arrhenius linealizada expresada en términos lineales como $y = a \cdot x + b$	46
3.1. Caracterización del aceite crudo y refinado obtenido de las semillas de <i>Hevea brasiliensis</i>	53
3.2. Tiempos de retención determinados en columna DB-5 de los principales AG	54
3.3. Composición de AG en el aceite de <i>Hevea brasiliensis</i> (%)	56
3.4. Métodos utilizados en la determinación de la composición de AG en el aceite de <i>Hevea brasiliensis</i>	56
3.5. Tiempos de retención de los metilésteres	57
3.6. Rendimiento de esteres metílicos por el método de microondas	59
3.7. Análisis de varianza para rendimiento por metilésteres por el método de microondas	61
3.8. Optimización de la respuesta utilizando el método de microondas	64
3.9. Rendimiento de esteres metílicos por el método de ultrasonido	65
3.10. Análisis de varianza para rendimiento por metilésteres por el método de ultrasonido	66

3.11: Optimización de la respuesta utilizando el método de ultrasonido	70
3.12. Cinética de reacción a una temperatura de 50 °C por el método de microondas	72
3.13. Constante de velocidad a diferentes temperaturas y parámetros para determinar Energía de activación	73
3.14. Cinética de reacción a una temperatura de 50 °C por el método de ultrasonido	75
3.15. Constante de velocidad a diferentes temperaturas	76
3.16. Comparación de variables obtenidas durante el proceso de transesterificación del aceite de semilla de <i>Hevea brasiliensis</i>	79

INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente urbanización y el incremento de la población; la demanda mundial de energía está aumentando, generando el consumo drástico de petróleo y sus derivados, así como, la inestabilidad de los precios y con esto también aumentan los niveles de contaminantes ambientales, como los GEI (gases de efecto invernadero), debido a la combustión de combustibles fósiles. Por lo que es necesaria la implementación de combustibles elaborados a base de materia orgánica denominada biomasa como una fuente potencial de energía renovable para sustituir parte del consumo de estos combustibles tradicionales. En los biocombustibles estudiados está el biodiesel, siendo un combustible en estado líquido obtenido a partir de materia grasa de origen animal o aceites vegetales, que pretende reducir el exceso de contaminación, siendo un combustible renovable y que no genera residuos tóxicos. Existen diferentes materias primas potenciales para la producción de biodiesel, generalmente, estas son obtenidas a partir de productos comestibles, no comestibles y microalgas. Dentro de los cuales los aceites vegetales no comestibles se encuentran en las materias primas de segunda generación y se pueden considerar como sustituciones prometedoras de los cultivos de alimentos comestibles tradicionales para la producción de biodiesel.

En general los dos mayores retos para el desarrollo de bioenergéticos son que la producción de insumos no compita con la producción de alimentos; y que no contribuyan al deterioro del ambiente local ni global. Uno de los productos agrícolas sin importancia en el ramo alimentario pero con potencial para la generación de biodiesel es la semilla del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), la cual tiene ciertas características que la hacen una fuente para la obtención de biodiesel, ya que se sabe contienen gran cantidad de aceites (40 – 60 % en peso); no presentan ningún propósito comestible; solo una pequeña parte de estas suele ser usada para resiembra; de acuerdo a datos reportados por el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), en coordinación con diversos organismos federativos

del país, en el año 2016 el principal estado con mayor superficie sembrada de árbol de *Hevea brasiliensis* fue Veracruz representando el 51.20 % del total nacional, considerando que una plantación de hule se establece con 400 - 476 árboles por hectárea. Además, los procesos convencionales para la producción de biodiesel suelen ser complejos, costosos y generan residuos o subproductos tóxicos debido a los químicos utilizados. Para la generación de biodiesel se han implementado el uso de tecnologías que utilizan química verde en la reacción de transesterificación, los cuales evitan el uso de solventes utilizando de manera eficiente las materias primas y disminuyen la generación de residuos. Dentro de estas tecnologías se encuentran la biocatálisis o biotransformaciones, la química asistida por ultrasonido y la química asistida por microondas, las cuales favorecen la reacción ya que se reducen significativamente los tiempos de procesamiento respecto a las síntesis convencionales, produciendo, además, un ahorro energético, la generación de menos subproductos, mayores rendimientos, entre otros.

El objetivo que se persigue en este proyecto es evaluar el efecto de la irradiación con ultrasonido y microondas en la síntesis enzimática de biodiesel a partir del aceite de las semillas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*). Por lo cual, en el actual trabajo se presenta una metodología para la obtención de biodiesel a partir del aceite de semillas de *Hevea brasiliensis* mediante una reacción de transesterificación alcohólica catalizada por la lipasa de *Candida antarctica B* (CAL B) comparando los rendimientos obtenidos por los métodos de asistencia de calentamiento asistido por ultrasonido y microondas.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Antecedentes

Onoji *et al.* (2016), determinaron la caracterización de las semillas de *Hevea brasiliensis*. Extrajeron el aceite presente en las semillas de caucho clonal NIG800 nigeriano usando un método por solvente logrando obtener un rendimiento del 43 % en peso después de la extracción durante 1 h. Caracterizaron el aceite por análisis GC-MS, FT-IR y NMR; y determinaron las propiedades fisicoquímicas obteniendo un bajo contenido de humedad (1.73 % en peso) lo que indica una mejor fuente de materia para la síntesis de biodiesel; el alto contenido de ácidos grasos saturados (30.67 % en peso) y ácidos grasos monoinsaturados moderadamente bajos (69.33 % en peso) confieren una buena vida útil en comparación con otros aceites; el perfil de ácidos grasos muestra un 64.11 % de ácido oleico y en menor cantidad con 13.85 % de ácido palmítico y 16.82 % de ácido esteárico.

Sabarish *et al.* (2016), evaluaron la esterificación ácida utilizando el aceite obtenido de la semilla de *Hevea brasiliensis*. Las semillas de caucho se sometieron a secado, mostraron que no hubo algún efecto significativo del tiempo o la temperatura de secado sobre el rendimiento de aceite obtenido. Para la esterificación utilizaron metanol y ácido sulfúrico al 5 %, tomando muestras a diversos tiempos durante la reacción. Con la cinética de esterificación de ácidos grasos libres (AGL) a partir del aceite de semilla de caucho con metanol en presencia de ácido sulfúrico se encontró que los resultados experimentales se ajustaban a una cinética de primer orden para la reacción directa y una de segundo orden para la reacción inversa.

Mardhiah *et al.* (2017), mencionan un análisis sobre la producción de biodiesel a través de un enfoque utilizando un catalizador heterogéneo con el fin de obtener un proceso sostenible para la producción industrial y mejorar la calidad de su combustible; considerando que el recurso verde de la materia prima y el catalizador

de biodiésel es el criterio principal para influir en el rendimiento de biodiésel y la sostenibilidad del proceso. Una de las ventajas del biodiesel derivado del aceite de semillas de caucho es que presenta baja emisión de gases de efecto invernadero. Mencionan los perfiles de ácidos grasos de diversas materias primas comestibles y no comestibles, entre las que se encuentra la *Hevea brasiliensis* con un 39.6 % de ácido linoleico, 24.6 % de ácido oleico, 16.3 % de ácido linolenico y en menor cantidad con 10.2 % de ácido palmítico y 8.7 % de ácido esteárico.

Panichikkal *et al.* (2018), demostraron las propiedades del aceite de semilla de caucho (RSO) y su potencial aplicación para producir biodiesel mediante transesterificación catalizada mediante el uso de lipasas. Indican que la semilla de caucho contiene 39.45 % de aceite en peso seco. Emplearon el diseño Box – Behnken (BBD) para optimizar el efecto combinado de diferentes parámetros independientes, a saber, la relación aceite-metanol, la unidad enzimática, la temperatura de reacción y el tiempo de reacción. En los experimentos obtuvieron un rendimiento de biodiésel del 99.52 % al nivel óptimo de lipasa (750 U), relación de metanol (1:10), temperatura (45 °C) y tiempo (4 h). Las propiedades de combustible del biodiesel obtenido bajo la condición de validación cumplieron con las especificaciones mencionadas en las normas ASTM D6751 y EN 14214.

Tan *et al.* (2019), estudiaron los recientes avances de la investigación sobre la transesterificación catalítica asistida por ultrasonidos (para mejorar la agitación entre reactivos inmiscibles) de aceites vegetales no comestibles utilizando catalizadores homogéneos y heterogéneos. Revisaron los factores principales que afectan el funcionamiento y la eficiencia de la transesterificación asistida por ultrasonido, como la relación molar de alcohol a aceite, la carga de catalizador, el tiempo de reacción, la temperatura de reacción, el consumo de energía, el tiempo de separación de fases, el modo de pulso ultrasónico y la conversión o rendimiento de biodiesel. Como ventajas en la utilización de este método de asistencia, indican que se proporciona una mezcla intensiva, también ofrece un calentamiento uniforme debido al aumento

de temperatura localizado y la formación de microchorros por el colapso transitorio de la cavitación y formación de microburbujas, reduciendo así el consumo de energía. Las condiciones óptimas para la transesterificación en dos pasos asistida por ultrasonido utilizando un catalizador homogéneo son en el primer paso: metanol:aceite (15: 1), 1.5 % en peso de H_2SO_4 ; 303 K, 120 min y el segundo paso: metanol a aceite (8.09: 1), 5.38% en peso de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 303 K, 13.2 min obteniendo un porcentaje de rendimiento de 97 %.

Orerome *et al.* (2019), realizaron la producción de biodiesel a partir de aceite de semilla de caucho (RSO) mediante transesterificación enzimática utilizando como catalizador la lipasa *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica. La reacción se llevó a cabo utilizando 5 g de aceite de semilla de caucho, 3 % de la enzima en base al peso del aceite y 6 equivalentes molares de alcohol. Se usó metanol como alcohol y la mezcla de reacción se agitó en un agitador de baño de agua a 150 rpm durante 50 horas a 40 °C logrando una conversión del 96.5 %. El aceite y el biodiesel producido a partir de la semilla de caucho se evaluaron como combustible y se compararon con el diésel de petróleo según sus propiedades físicas y químicas, como gravedad específica, valor de saponificación, índice de acidez, valor de ácidos grasos libres (FFA). Algunos de los resultados obtenidos mostraron que el éster metílico de ácidos grasos (FAME) tiene un peso específico de 0.897, un índice de acidez de 0.657 mg KOH / g, un valor de FFA de 0.330 mg de KOH / g. Los valores obtenidos estuvieron dentro de los límites estándar de biodiésel de la ASTM.

Sitepu *et al.* (2020), indican revisiones hechas sobre la obtención de biodiesel a partir de diversas materias primas de cultivos de semillas oleaginosas (comestibles y no comestibles) mediante la transesterificación directa (DT). Mencionan recursos de cultivos / biomasa para la producción de biodiésel mediante diversas materias primas, entre las que se encuentra la semilla de caucho que presenta cerca del 40 – 60 % de aceite; así como, un resumen de los métodos de transesterificación catalítica de algunos aceites no comestibles seleccionados, teniendo para la *Hevea*

brasiliensis se ha utilizado metanol y ácido sulfúrico como catalizador homogéneo a una temperatura de 56 °C durante un tiempo de 4 horas obteniendo un rendimiento de conversión del 93 %. Mencionan que las propiedades del biodiésel de la semilla de caucho (*Hevea brasiliensis*) cumplieron con las normas de biodiésel ASTM 6751-12 y EN14214.

Oladipo y Betiku (2020), establecen las condiciones óptimas para el proceso de transesterificación en la conversión del aceite de *Hevea brasiliensis* (HBO) en ésteres metílicos (HBOME) utilizando un catalizador heterogéneo sintetizado a partir de un residuo biológico (cáscara de vaina de nuez de cola). Identificaron la influencia de la concentración de catalizador, la relación molar MeOH: HBO, el tiempo de reacción y la temperatura de reacción en el rendimiento de HBOME utilizando el enfoque de diseño de matriz ortogonal. Mostraron que se podía conseguir un rendimiento de ésteres metílicos de 96.97 % en peso usando una cantidad de catalizador de 3.5 % en peso, una relación molar de MeOH: HBO de 6:1, un tiempo de reacción de 75 min y una temperatura de reacción de 65 °C. Por lo tanto, el HBO y la cáscara de la nuez de cola podrían servir como recursos biológicos baratos para la producción de biodiesel.

1.2 Árbol del hule (*Hevea brasiliensis*)

1.2.1 Características generales

La especie *Hevea brasiliensis* Müell. Arg. pertenece al género *Hevea*, su nombre proviene de la palabra hyévé o hevé y se traduce como “árbol que llora” o “árbol de lágrimas”. Originario de las planicies Amazónicas, se haya silvestre en Bolivia, Perú, Colombia y las regiones del Matto Grosso y Marrano en Brasil (Aguirre y Santoyo, 2013). Algunos de los nombres comunes que se le han dado a este fruto son Árbol de Hule, Árbol de caucho, goma o rubber.

En la Tabla 1.1 se presenta la posición taxonómica de *Hevea brasiliensis*:

Tabla 1.1. Características taxonómicas de *Hevea brasiliensis*

Reino	Plantae
Orden	Euphorbiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	<i>Hevea</i>
Especie	<i>brasiliensis</i>

Es un árbol robusto, de crecimiento rápido, con un tronco recto y una corona de hojas abiertas. La corteza suele ser gris y bastante lisa. En la naturaleza, los árboles pueden crecer hasta más de 40 m con una vida útil de más de 100 años. Una plantación típica tiene alrededor de 350 - 500 árboles/ha con cada árbol produciendo alrededor de 800 semillas por año. El rendimiento normal promedio de semillas reportado en la literatura varía de 70 a 500 kg/ha anualmente. Factores como la edad del árbol, las variedades clonales, las densidades de siembra y las enfermedades afectan el rendimiento anual (Onoji *et al.*, 2016). La especie fructifica de mayo a septiembre.

1.2.2 Descripción de las características de la semilla

Los frutos están constituidos por una cápsula de tres celdillas que contienen una semilla cada una, estas se encuentran cubiertas de un tegumento coriáceo, café brillante, decorado con manchas blanquecinas. Un kilogramo de semillas contiene cerca de 250 a 350 unidades según el origen (Rojo *et al.*, 2011). Las semillas son de forma ovoide de 18 a 24 mm de largo y de 18 a 20 mm de ancho, la cubierta externa de la semilla tiene manchas (vetas) de color café y negro brillante de 1.0 a 1.5 mm de grosor (Salazar *et al.*, 2000). El peso de la semilla de caucho fresco varía de 2 a 5 g. Se ha encontrado que la semilla de caucho contiene sustancias tóxicas tales como glucósido cianogénico y ácido cianhídrico (HCN) en el grano fresco. La concentración de HCN podría reducirse efectivamente cuando se almacena durante un período no inferior a 2 meses a temperatura ambiente (Onoji *et al.*, 2016).

1.2.3 Cultivo en México

El árbol de hule (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) es una especie endémica de las selvas tropicales de la Amazonia, aunque se ha introducido en otras regiones tropicales del mundo, principalmente, en el continente asiático y en algunas partes de América Latina, entre ellas México, el cual tiene las condiciones edáficas y climáticas óptimas para establecer plantaciones de hule en los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Tabasco (González *et al.*, 2017). Según información de la SAGARPA, SIAP e INIFAP, en el 2009 México contaba con 350 479 ha de tierras de alto potencial y otras 3 351 551 ha de menor potencial para cultivar el árbol de hule (Aguirre y Santoyo, 2013). De acuerdo a datos reportados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el año 2016 el principal estado con superficie sembrada de árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) fue Veracruz representando el 51.20 % del total nacional, Chiapas representa al segundo lugar con el 20.65 %, Tabasco y Oaxaca cuentan con el 14.31 % y 13.73 %, ocupando el tercer y cuarto lugar respectivamente, y Puebla con el 0.11 % se encuentra en el quinto lugar (SIAP, 2016).

En la Tabla 1.2 se puede observar los estados de la República Mexicana con superficie sembrada de *Hevea brasiliensis* (SIAP, 2016).

Tabla 1.2. Principales estados de la República Mexicana con producción de *Hevea brasiliensis* (SIAP, 2016)

Año	Superficie Sembrada (ha)					
	Veracruz	Chiapas	Tabasco	Oaxaca	Puebla	Total
2014	14597.67	5777.65	4237.56	4034.5	31	28678.38
2015	14962.5	5805.15	4288.03	3978.5	32	29066.18
2016	15451	6230.65	4320.04	4143.5	32	30177.19

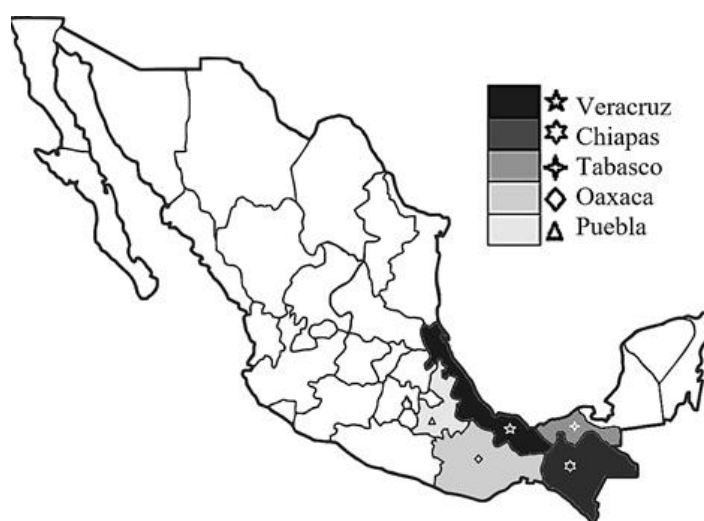


Figura 1.1. Principales estados con superficie sembrada de *Hevea brasiliensis* en la República Mexicana (Aguirre y Santoyo, 2013)

1.2.4 Aprovechamiento

Las semillas de caucho son baratas, fácilmente disponibles y normalmente consideradas como desechos (con excepción de los fines de cultivo) y, por tanto, hasta la producción natural de semillas de caucho está muy infrautilizada (Sabarish *et al.*, 2016). Los estudios han demostrado que el aceite de las semillas de caucho o RSO (por sus siglas en inglés, rubber seed oil) tiene muchas áreas de aplicaciones

potenciales entre las cuales se encuentran como lubricante, tinta de impresión, agente espumante en espuma de látex, pinturas y revestimientos, entre otros. La torta de semillas obtenida al extraer el aceite tiene una aplicación potencial en la formulación de piensos para el ganado y como fertilizante nitrogenado (Iyayi *et al.*, 2008).

El rendimiento y las emisiones de biodiesel a partir RSO han sido probados y comparados con otros biodiesel a base de vegetales, y se encontró que era un aceite vegetal adecuado para la producción de biodiesel. Se ha encontrado que presenta las más bajas emisiones de CO₂ y NO₂ de los aceites vegetales probados. Un factor adicional que hace de RSO una opción atractiva para la producción de biodiesel es la extensión de las plantaciones de caucho, eliminando así la competencia por el espacio de tierra con cultivos de hortalizas (Zhu *et al.*, 2014).

1.2.5 Estudios previos en la composición

a) Aceite de semilla de caucho

Las semillas de caucho contienen cerca del 40 – 60 % de aceite, siendo de color marrón. El tipo y porcentaje de ácidos grasos contenidos en el aceite vegetal depende de la especie y de las condiciones de crecimiento de la planta (Ramadhas *et al.*, 2005). En la Tabla 1.3 se puede observar el perfil de ácidos grasos presentes en mayor cantidad en el aceite obtenido de la semilla de caucho (Onoji *et al.*, 2016):

Tabla 1.3. Perfil de AG presentes en el aceite de las semillas de *Hevea brasiliensis*

Ácidos Grasos (AG)	Porcentaje (%)
Palmítico (C16:0)	0.23 – 10.6
Estearico (C18:0)	5.69 – 12
Oleico (C18:1)	12.7 – 42.08
Linoleico (C18:2 n-6)	39.6 – 52.84
α-Linolenico (C18:3)	2.38 – 26

b) Ésteres metílicos obtenidos del aceite de las semillas de caucho

Las propiedades del combustible del éster metílico del aceite de semilla de caucho en comparación con las propiedades del diésel estándar, así como, los procedimientos experimentales adoptados para el análisis de propiedad de combustible se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Propiedades de los ésteres metílicos del biodiesel obtenido a partir del aceite de semilla de *Hevea brasiliensis* en comparación con el diésel estándar

Propiedad	Prueba	Biodiesel estándar ASTM 6751-02	Metilésteres de aceite de <i>Hevea brasiliensis</i>
Gravedad específica	ASTM D4052	0.87 – 0.90	0.874
Valor calorífico (MJ/kg)	ASTM D240	-	36.50
Viscosidad a 40 °C (mm ² /s)	ASTM D445	1.9 – 6.0	5.81
Punto de inflamación (°C)	ASTM D93	min. 130	130
Punto de enturbiamiento (°C)	ASTM D2500	-3 a 12	4
Punto de ebullición (°C)	ASTM D97	-15 a 10	-8
Valor ácido (mg KOH/g)	ASTM D974	0.8	0.118

La mayoría de las propiedades de combustible del éster metílico de aceite de semilla de caucho son bastante comparables con las del diésel. La composición C, H, O de los ésteres metílicos de aceite de semilla de caucho es 76.85 %, 11.82 % y 11.32 %, respectivamente. Los valores caloríficos de los ésteres metílicos son más bajos que los del diésel debido a su contenido de oxígeno. La presencia de oxígeno en el biodiesel ayuda a la combustión completa del combustible en el motor (Ramadhas et al., 2005).

1.3 Aceite

1.3.1 Generalidades

El término grasa o aceite (también denominados lípidos) se define como nombre genérico de sustancias orgánicas, de origen vegetal o animal, que consisten predominantemente en mezclas de ésteres de glicerina con los AG (ácidos grasos), es decir, triglicéridos (Bailey, 2001). La denominación de “grasas y aceites” se refiere al estado físico sólido o líquido, respectivamente, de este tipo de lípidos a la temperatura ordinaria y mismas condiciones. Una grasa con ácidos grasos de enlaces simples se denomina saturada; es una cadena recta, lo que le confiere una estructura regular. En cambio, cuando en un aceite hay uno o varios enlaces dobles, se denomina insaturado y la cadena se orienta por la presencia de dos elementos hidrogeno del mismo lado del doble enlace de forma permanente, lo que genera una estructura más irregular (Ureta *et al.*, 2015). Cuando varias de las moléculas se ordenan, hay menos puntos de contacto, disminuyendo la rigidez y aumentando la movilidad.

1.3.2 Composición

En general los aceites se encuentran constituidos por (Bailey, 2001):

- Glicéridos
 - ✓ Triglicéridos. Formados por la condensación de una molécula de glicerol con tres de ácidos grasos, para dar tres moléculas de agua y una de triglicérido. Si participan tres ácidos grasos iguales, se obtendrá un triglicérido simple pero si son diferentes se obtendrá uno mixto.
 - ✓ Mono y Diglicéridos. Contienen únicamente uno y dos radicales ácidos grasos respectivamente y, por consiguiente, tienen grupos hidroxilos libres.
- Ácidos grasos. Compuestos alifáticos monobásicos, constituidos generalmente por un solo grupo carboxilo situado en el extremo de una cadena carbonada lineal.

- Componentes no glicéridos. Sustancias de propiedades y composición diferentes a la de los glicéridos.
 - ✓ Fosfátidos. Constituidos por un polialcohol (generalmente, aunque no en todos los casos, el glicerol), esterificado con ácidos grasos y ácido fosfórico, que a su vez está se encuentra combinado con un compuesto básico nitrogenado.

1.3.3 Clasificación

Los aceites vegetales pueden dividirse en (Legaz, 2010):

- Aceites Saturados. Sólo tienen enlaces sencillos entre átomos de carbono adyacentes, es decir, los átomos de carbono de las cadenas presentes están unidos a no menos de dos átomos de hidrógeno; no contienen dobles enlaces. Índices de yodo de 5-50.
 - ✓ Lóricos: copra, palmito, babasú (etc.)
 - ✓ Palmíticos: palma
 - ✓ Esteáricos: karité
- Aceites Monoinsaturados. Un doble enlace en la molécula. Índices de yodo de 50-100.
 - ✓ Oleicos: aceituna, cacahuete, semilla de girasol, jatropha curcas.
- Aceites Biinsaturados: Dos doble enlaces en su molécula. Índices de yodo de 100-150.
 - ✓ Linoleico: girasol, algodón, maíz, soja, etc.
- Aceites Poliinsaturados. Contiene mayor cantidad de dobles enlaces en su estructura, son líquidos a temperatura ambiente y algunos reaccionan con el oxígeno del aire lo que aumenta su posibilidad de enranciamiento. Índices de yodo > 150.

El número de Yodo es un indicador de los enlaces dobles que se presentan en la estructura molecular. Influye en la estabilidad de las propiedades cuando se quiere almacenar por largo tiempo.

1.3.4 Usos

El aprovechamiento de los aceites es importante desde distintos puntos de vista (Bailey, 2001):

- ✓ Nutricional. Las grasas y aceites tienen el carácter de alimentos energéticos y como fuente de sustancias beneficiosas (tocoferoles, ácido oleico, etc.). Actúan, por otra parte, como vehículos de las vitaminas liposolubles (A, D, E, K), además de aportar vitamina F.
- ✓ Químico-industrial. Se utilizan en la fabricación de barnices, cosmética, pinturas, jabonería.

De cualquier modo, se ha buscado una nueva aplicación de los aceites, como es la utilización de estos y sus ésteres metílicos como fuente para la producción de combustibles orgánicos (biocombustibles).

1.3.5 Extracción

Los aceites vegetales son obtenidos de las semillas o frutos oleaginosos que los contienen mediante extracción química con solventes (hexano, acetato de metilo, éter dietílico, etc.) o por medios físicos como la aplicación de grandes presiones.

a) Extracción con solventes

La extracción de aceites a partir de muestras sólidas puede realizarse mediante el uso de disolventes y es conocida como extracción sólido-líquido o lixiviación. Es un método utilizado en la separación de analitos de muestras sólidas aprovechando las diferencias de solubilidad en los componentes. La extracción por disolventes es el método más eficiente para la extracción del aceite, ya que se requiere menos calentamiento, se obtiene un aceite de mejor calidad, con menos impurezas y se ahorra más energía que mediante la presión mecánica (Gonzalez, 2013). En el proceso un disolvente líquido, generalmente hexano, es puesto en contacto con

semillas previamente molidas para que se produzca la disolución de la fracción oleosa en el solvente. A continuación, éste se destila y se puede reutilizar. El solvente más utilizado industrialmente debido a su alta selectividad hacia los glicéridos es el hexano, además, tiene facilidad de recuperación debido a su alta volatilidad (Avellaneda, 2010).

1.3.6 Refinación

Los aceites o grasas obtenidos de animales o semillas oleaginosas se denominan brutos o crudos cuando son recién extraídos. Los triglicéridos tienen cantidades variables de otras sustancias que se encuentran de forma natural, como AGL, proteína, fosfolípidos, fosfátidos, ceras, resinas y pigmentos. Aunque estén presentes en porciones muy pequeñas, estas sustancias añaden colores, olores y sabores extraños, inestabilidad y formación de espuma y humo (Martínez *et al.*, 2011). Por eso, el aceite que se quiera utilizar para la producción de biodiesel debe estar refinado. Esto indica que el aceite debe pasar por un proceso donde es sometido a operaciones que retiren gran cantidad de sustancias no requeridas.

a) Secado de la miscela

El sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) tiene propiedades higroscópicas siendo un desecante neutro. Mantiene partículas de agua consigo, formando una sal heptahidratada, es lento pero eficaz y económico. Adecuado para desecar compuestos fácilmente descomponibles, como ácidos grasos, aldehídos, cetonas, halogenuros de alquilo (Gibaja, 1998).

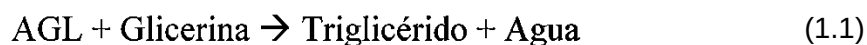
b) Sustancias sólidas en estado coloidal

Mucílagos, fosfátidos, pectinas, proteínas, resinas, etc., responsables de la turbiedad del aceite que con el tiempo pueden polimerizar y precipitar (Rodríguez, 2006). La formación de espumas se favorece en las interfaces aceite/aire donde los fosfolípidos se orientan con la zona hidrófila hacia el aire.

Esto resulta extremadamente desventajoso, ya que aumenta demasiado la superficie de contacto entre el oxígeno presente en el aire y la grasa, facilitando reacciones de oxidación. La eliminación conocida como desgomado, se da por coagulación de la dispersión coloidal con ayuda o no de un floculante. La operación de desgomado es realizada en dos etapas para eliminar los fosfátidos hidratables y no hidratables (Hernández *et al.*, 2007).

c) Ácidos grasos libres (AGL)

Surgen de la hidrólisis de las grasas y del desdoblamiento enzimático. Su eliminación se basa en propiedades diferenciales del ácido libre respecto a los glicéridos (Rodríguez, 2006). En la Ecuación 1.1 se muestra una manera de aprovechar la diferente actividad reactiva de los ácidos libres que consiste en esterificarlos con glicerina (neutralización química), con lo que el ácido presente se readquiere en la forma más noble posible, como glicérido (Triglicérido):



1.4 Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que catalizan o aceleran la velocidad de las reacciones químicas hasta alcanzar un equilibrio mediante procesos regioselectivos (afecta solo una posición específica de la molécula) y estereoselectivos que conducen a la obtención de los compuestos de interés.

Existen diferentes enzimas o biocatalizadores, siendo las hidrolasas las más utilizadas en procesos industriales (Figura 1.2). Dentro de las hidrolasas se encuentran las lipasas y las proteasas (Claramunt *et al.* 2013).

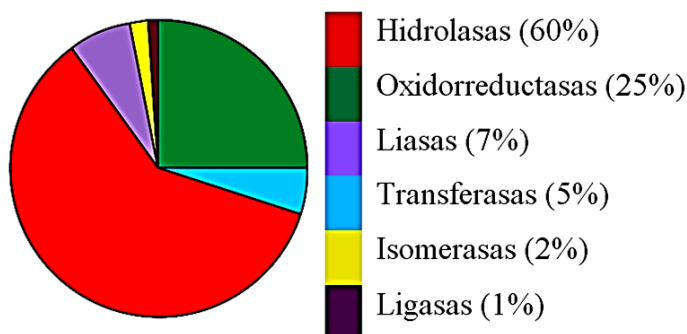


Figura 1.2. Tipos de biocatalizadores.

1.4.1 Reacción enzimática

Las lipasas catalizan de forma natural la hidrólisis de ésteres, especialmente triacilglicéridos de cadena larga, para dar monoacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol. También son capaces de catalizar la reacción inversa, (esterificación y transesterificación), en ambientes microacuosos.

La actividad del agua en el medio de reacción determina equilibrio entre la reacción directa (hidrólisis) y la reacción inversa (síntesis) (García, 2005). La hidrólisis enzimática es aquella que se ocasiona por un grupo de enzimas llamadas hidrolasas.

En estas reacciones (Ecuación 1.2), la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar el complejo Enzima/Sustrato (ES). Después tiene lugar una transformación intermedia Enzima/Compuesto Intermedio (EI), seguido por la transformación del sustrato (S) en producto (P), Enzima/Producto (EP), liberándose el producto (P) y quedando libre la enzima (E) para una nueva unión con el sustrato (De Lera Santín, 2011).



Los biocatalizadores como las lipasas tienen la ventaja de ser más selectivos, biodegradables, menos tóxicos y permiten utilizar condiciones de reacción más suaves. Específicamente, son enzimas usadas en los organismos para degradar la grasa de los alimentos de manera que se puedan absorber, por ello son utilizadas en catálisis de triacilglicéridos.

1.4.2 Lipasa *Candida antártica* (CAL)

La *Candida antártica* es una levadura basidiomiceta que, como indica su nombre fue aislada en la Antártida con el propósito de encontrar enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formulaciones de Industriales (Figura 1.3). Su lipasa (CAL) es posiblemente de las más versátiles de todas las lipasas utilizadas en biotransformaciones (José, 2013).

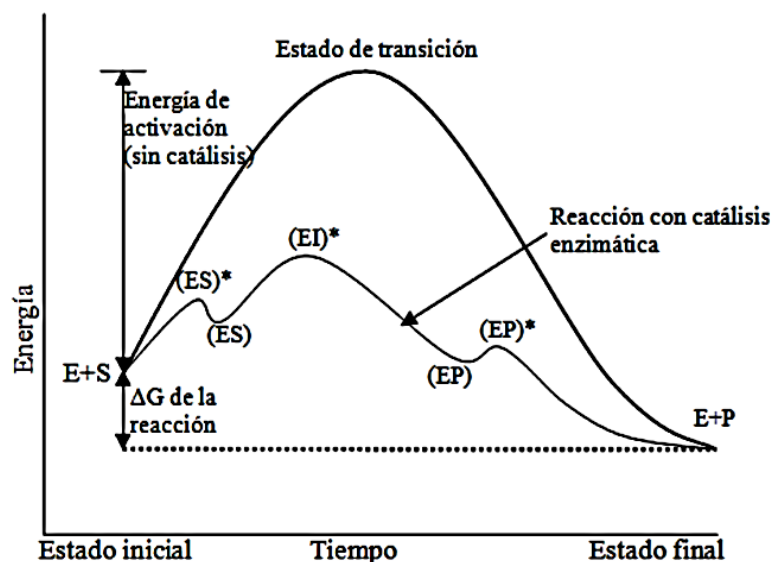


Figura 1.3. Diferencia de energía que necesita una reacción no catalizada (línea más gruesa) y la misma reacción con catálisis enzimática (línea fina). (Lodeiro, 2015)

La lipasa de *Candida antártica* en su hospedador natural es sintetizada en sus dos isoformas, A y B (Figura 1.4 y Tabla 1.5) (José, 2013):

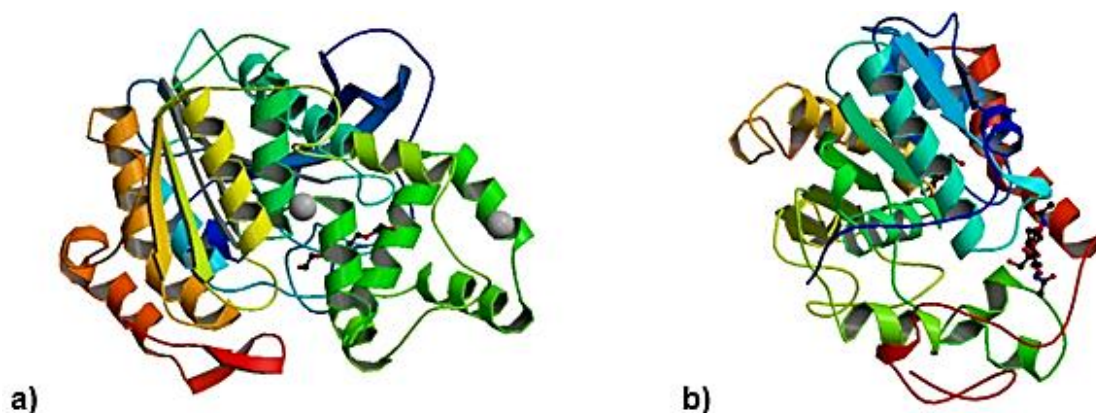


Figura 1.4. Representación de las isoenzimas de *Candida antártica*: a) CAL A, b) CAL B (RCSB PDB, 2016)

Tabla 1.5. Características de las isoformas de la lipasa CAL

Propiedad		CAL A	CAL B
Peso Molecular (kD)		45	33
Punto Isoeléctrico (pI)		7.5	6.0
pH óptimo		7	7
Actividad específica (LU/mg)		420	435
Termoestabilidad a 70 °C	20 min	100	15
	120 min	100	0
pH estabilidad		6 - 9	7 - 10
Activación Interfacial		Si	No
Especificidad posicional hacia triglicéridos		Sn-2	Sn-3

En la preparación comercial de CAL B, la isoforma B es purificada, clonada y el gen que codifica para dicha lipasa es transferido y expresado en células de *Aspergillus oryzae*, la cual lo produce. Luego, la enzima se inmoviliza sobre una resina acrílica macroporosa, esto aumenta la estabilidad térmica del catalizador y modifica su modo aparente de desactivación en relación con la enzima nativa (Sharma *et al.*, 2001). Es una proteína que tiene un pH óptimo de actividad de 7 y es estable entre 3.5 y 9.5 (Quesada, 2014).

Se ha estudiado su uso en la síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos en la producción de un biocombustible a partir de aceites vegetales como lo es el biodiesel.

1.5 Bioenergía

Según la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) se trata de la energía derivada o producida a partir de los biocombustibles (FAO, 2013).

1.5.1 Biocombustibles

Biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible de origen biológico obtenidos de manera renovable a partir de productos llamados biomasa, los cuales se deben quemar para obtener energía en forma de calor o luz (Guo *et al.*, 2015). Los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos, los dos últimos son los que proporcionan mayores beneficios ambientales (Lombana *et al.*, 2015).

1.5.2 Biomasa

Según la FAO el término se refiere los materiales no fósiles de origen biológico, tales como los cultivos energéticos, los desechos agrícolas y forestales y sus subproductos, el estiércol o la biomasa microbiana (FAO, 2013).

1.5.3 Clasificación de los biocombustibles

La clasificación más difundida agrupa los biocombustibles no por su composición química, que varía poco, sino en función del tipo de materia orgánica (biomasa) de la utilizada en su producción (Tabla 1.6); por lo que, se tienen biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Lombana *et al.*, 2015).

Tabla 1.6. Clasificación de los biocombustibles

Generación	Materia prima	Ejemplo
Primera generación	Cultivos alimentarios	Maíz, Caña de azúcar, Soya
Segunda generación	Cultivos no alimentarios Aceites y grasas no aptas para consumo humano	Álamo, Jatrofa, Higuera
Tercera generación	Vegetales no alimenticios de crecimiento rápido	Pastos perennes, Algas verdes
Cuarta generación	Bacterias genéticamente modificadas que emplean carbono para la producción de biocombustibles	

1.5.4 Biodiesel

Biodiesel o FAME (Fatty Acid Methyl Ester, ésteres monalquílicos de ácidos grasos) es un combustible líquido que sirve como reemplazo del gas oil (diésel oil por su nombre en el mercado internacional) y se obtiene a partir de materias primas renovables (biomasa). Además, el biodiesel es derivado del aceite vegetal, grasas animales, lípidos de algas o grasa residual (Guo *et al.*, 2015).

El biodiesel se ha propuesto como una opción viable para la suplementación de combustibles fósiles y es probable que sea un contribuyente clave a la demanda mundial de energía. La principal restricción para la producción de biodiesel es la falta de materia prima disponible para producirlo a una escala suficientemente grande.

Las tres fuentes principales de aceite para la producción de biodiesel se originan a partir del uso de aceites comestibles, aceites no comestibles y microalgas.

Debido a la competencia por el uso del suelo con los cultivos alimentarios, los aceites comestibles son menos viables, y actualmente la producción de microalgas es demasiado costosa para ser producida a gran escala, dejando los aceites no

comestibles como una mejor fuente de obtención de aceites para la producción de biodiesel. Sin embargo, todavía se necesitan otras opciones viables, especialmente a la luz de la producción a gran escala necesaria para suministrar suficiente aceite y satisfacer las demandas de energía y competencia por el espacio terrestre con los cultivos alimentarios.

Se debe considerar que una oleaginosa alternativa ideal para la producción de biodiesel debe caracterizarse por una gran adaptabilidad climática a la región donde se cultiva (lluvias o sequías, tipo de suelo, latitud, etc.), disponibilidad en la región, gran contenido de aceite, bajo contenido de AGL, compatibilidad con la estructura existente en el campo, bajas necesidades agrícolas (fertilizantes, agua, pesticidas), crecimiento dado por temporada, maduración uniforme en su cosecha, uso potencial para los subproductos y la capacidad de crecer en tierras no favorables para la agricultura y/o fuera de temporada de los cultivos tradicionales (Avellaneda, 2010). El aceite de semilla de caucho, derivado de *Hevea brasiliensis*, es una alternativa emocionante con gran potencial para su uso en la producción de biodiesel (Zhu *et al.*, 2014).

a) Ventajas de los aceites no comestibles

La evaluación preliminar de varios cultivos de semillas oleaginosas no comestibles para su crecimiento, materia prima y adaptabilidad muestra que estas reservas tienen las siguientes ventajas (Atabani *et al.*, 2013):

- a) La adaptabilidad del cultivo de materias primas de aceite no comestibles en tierras marginales y no agrícolas con baja fertilidad y demanda de humedad.
- b) Se pueden cultivar en zonas áridas (hasta 20 cm de precipitación), así como en zonas de mayor precipitación e incluso en terrenos con cubierta de suelo. Además, pueden propagarse a través de semillas o esquejes.
- c) Tienen un enorme potencial para restaurar las tierras degradadas, crear empleo rural y fijar emisiones de CO₂ de hasta 10 t/ha/año.

- d) No compiten con los recursos agrícolas existentes. Se requieren menos tierras de cultivo y se puede utilizar una mezcla de cultivos.
- e) Eliminan la competencia por alimentos y piensos. Algunos aceites no comestibles no son adecuados para alimentos humanos debido a la presencia de algunos componentes tóxicos en los aceites.
- f) Las materias primas no comestibles pueden producir subproductos útiles durante el proceso de conversión, que pueden ser utilizados en otros procesos químicos o quemados para la generación de calor y energía.

b) Ventajas de la utilización de biodiesel

Las principales ventajas son:

- Extiende la vida útil de los motores, debido a que presenta mayor lubricidad que el diésel de origen fósil.
- Presenta un punto de inflamación mayor que el diésel fósil. El biodiesel podría explotar a una temperatura de 150°C; por lo que, es más seguro transportarlo y almacenarlo.
- En comparación del diésel fósil, puede degradarse 4 a 5 veces más rápido y podría ser utilizado como solvente en la limpieza de diésel fósil.
- No requiere altos niveles de inversión, su producción promueve la inclusión social de los habitantes y permite al productor agrícola autoabastecerse de combustible.
- No genera SO₂ (dióxido de azufre) un gas que contribuye en forma significativa a la contaminación ambiental, debido a que contiene poca cantidad de azufre
- Por su contenido no contamina acuíferos subterráneos ni fuentes de agua superficial.

c) Método de obtención de biodiesel

El proceso más utilizado a nivel mundial ya que ha arrojado los mejores resultados en la producción de biodiesel requiere de 5 pasos generales (Gonzalez, 2013) y uno adicional para la purificación del subproducto (Figura 1.5):

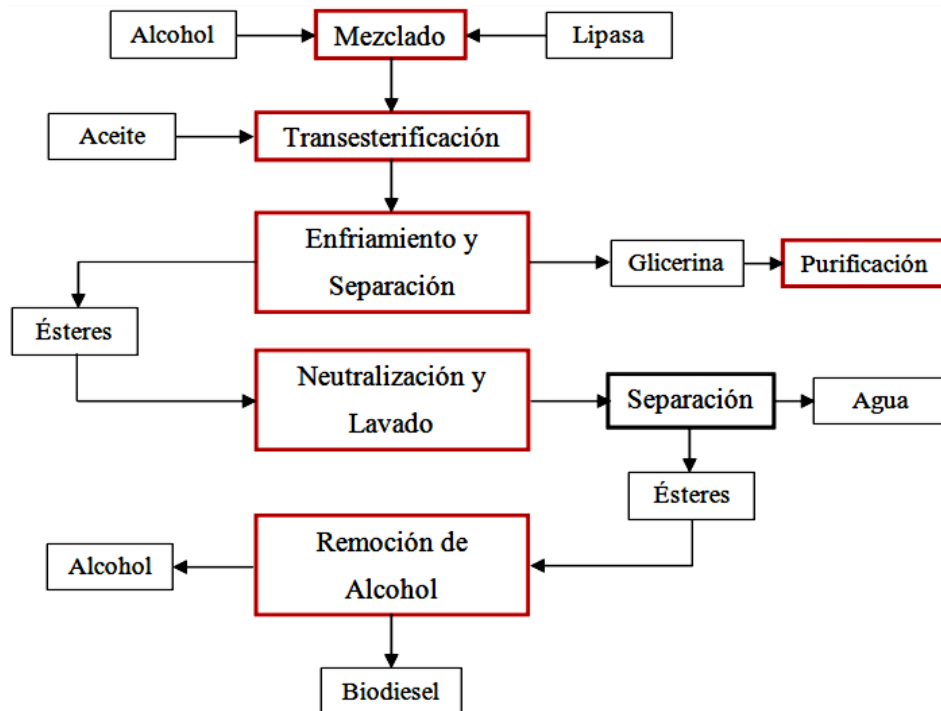


Figura 1.5. Método general de obtención de biodiesel

d) Reacción de transesterificación

El biodiesel obtenido mediante la transesterificación o alcoholólisis de aceites vegetales utilizando enzimas como catalizadores, es igual al obtenido por los procesos convencionales a través de catálisis inorgánica (Rojas *et al.*, 2010). En la reacción estequiométrica (Ecuación 1.3) intervienen un mol de triglicérido y tres moles de alcohol (usualmente metanol) en presencia de un catalizador (lipasa) para producir un mol de glicerina y tres moles de alquil-éster (biodiesel); sin embargo, se usa alcohol en exceso para aumentar la producción de ésteres alquílicos y permitirles separar el glicerol de la fase formada. En la Ecuación 1.3 se muestra la reacción de transesterificación utilizando enzimas:



El rendimiento de la esterificación es independiente del tipo de alcohol utilizado, por lo que la selección de se basará en consideraciones de costo y rendimiento. El metanol se usa comercialmente debido a su bajo precio.

El proceso de transesterificación consiste en una secuencia de tres reacciones reversibles consecutivas (Figura 1.6). Es decir, conversión de triglicéridos en diglicéridos, seguida de la conversión de diglicéridos en monoglicéridos. Los glicéridos se convierten en glicerol y producen una molécula de éster en cada paso. Las propiedades de estos ésteres son comparables a las del diésel (Ramadhas *et al.*, 2005).

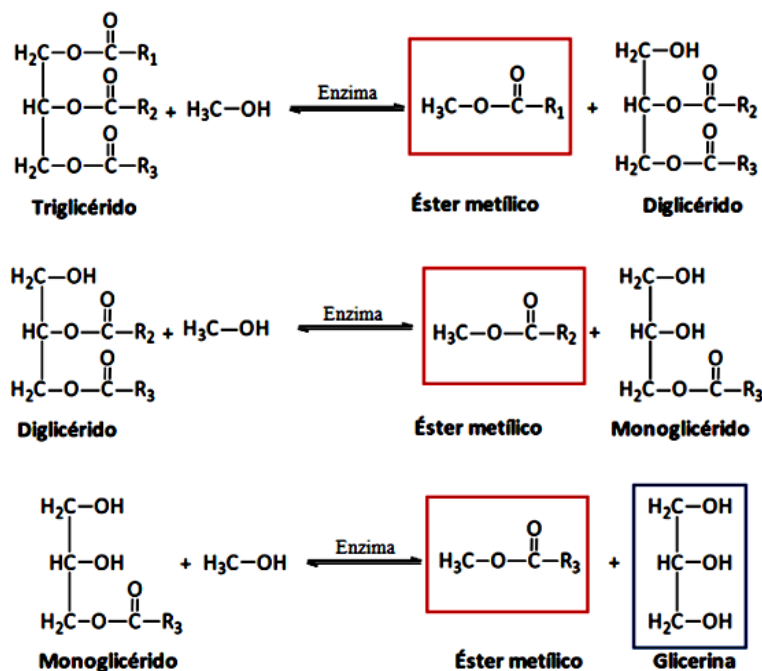


Figura 1.6. Reacciones reversibles consecutivas en la transesterificación

e) Calidad de las materias primas para la obtención de biodiesel

La producción de biodiesel necesita la reacción de algún alcohol (comúnmente etanol o metanol) con el aceite (comestible o no comestible) en la presencia de un catalizador (acelerador de reacciones o procesos) apropiado.

f) Calidad del aceite

Los triglicéridos deben tener menos de 1 % de AGL y todas las demás sustancias a reaccionar deben ser lo más anhidras posible. Si la acidez es mayor entonces se necesita antes neutralizar los AGL. El contenido de humedad debe ser menor a 0.05 % ya que puede provocar saponificación lo cual aumenta la viscosidad y puede formar geles haciendo la separación del glicerol más difícil (Rodríguez, 2006).

g) Calidad del alcohol

Para evitar que se forme una emulsión estable entre la glicerina y el biodiesel al finalizar la reacción, se debe emplear un alcohol preferiblemente de cadena corta (Rojas *et al.*, 2010). Los alcoholes más utilizados son metanol y etanol, pero se pueden usar otros alcoholes de cadena larga como son propanol, butanol, ISO-propanol, aunque, estos alcoholes son más costosos. El metanol utilizado con una pureza mayor o igual a 99.90 % asegura que se lleve a cabo completamente la reacción (Rodríguez, 2006).

h) Variables que afectan a las lipasas en la reacción de transesterificación

La reacción de diferentes variables trasciende en la calidad y rendimiento del biodiesel obtenido y las características fisicoquímicas del biocombustible. La alcoholólisis usando aceites vegetales depende del tiempo y temperatura de reacción, relación molar alcohol:aceite, tipo de alcohol, tipo y concentración de catalizador, intensidad del mezclado, contenido de ácidos grasos libres (AGL) y humedad; sin embargo, cuando se utilizan lipasas se deben considerar otras variables como (Rojas *et al.*, 2010):

- Contenido de ácidos grasos libres (AGL) y humedad. En la catálisis enzimática no se promueve la reacción de saponificación con altos valores de estos parámetros debido a la alta especificidad de las enzimas. Algunas lipasas requieren de la interfase agua-aceite para iniciar su actividad catalítica; sin embargo, en medios muy acuosos favorecen la reacción de hidrólisis por lo que debe considerarse que un incremento en el contenido de agua superior al valor límite disminuye la formación de ésteres.
- Temperatura de reacción. El rango de temperatura más usado en la catálisis enzimática es entre 35 a 50 °C. Cuando se utiliza un solvente en la reacción las altas temperaturas lo evaporan; además que, se desnaturalizan las lipasas.
- Tiempo de reacción. Este parámetro en general es mayor que el usado en catálisis diferentes.
- Relación molar alcohol:aceite vegetal. Se debe mantener en la catálisis enzimática, de acuerdo a la estequiometría de la reacción, una relación molar alcohol:aceite de 3:1 pero como la alcoholólisis es reversible se necesita añadir un excedente de alcohol para favorecer la reacción directa. Para evitar que el alcohol produzca la inhibición de las enzimas, se agrega esté durante la reacción a diferentes tiempos, como puede ser el caso donde se hacen tres adiciones consecutivas en relación 1/3 del equivalente molar del alcohol.
- Tipo de alcohol. El rendimiento obtenido en la reacción está sujeto por alcohol y la lipasa utilizada. Debido a que algunas lipasas dan mejor rendimiento con alcoholes de cadena larga en comparación a los alcoholes de cadena corta.
- Solvente. Se suelen utilizar solventes como hexano, terbutanol, octano, acetona y éter de petróleo; para liberarse de inconvenientes por solubilidad. Al utilizar enzimas inmovilizadas se pueden obtener mejores rendimientos con solventes de tipo no polar, debido a que estos solventes no eliminan el agua esencial de las enzimas, extendiendo su actividad catalítica. El rendimiento en la reacción de alcoholólisis aumenta con el uso solvente, se debe tener en cuenta que también aumentan los costos de producción al recuperar y purificar dicho solvente.

- Concentración de biocatalizador. La concentración para hacer uso de un biocatalizador depende de la lipasa y las condiciones del proceso, considerando que, una cantidad alta de biocatalizador limitara el rendimiento, lo cual se debe a que la viscosidad del medio incrementa, lo que dificulta el contacto entre los componentes presentes en la reacción.
- Intensidad del mezclado. Durante el transcurso de la reacción se forma un sistema de tres fases inmiscibles entre el aceite, el metanol y la enzima. Para este tipo de catálisis se sugiere una velocidad de agitación de 150 a 200 rpm para no afectar la estructura de la lipasa. Si la lipasa utilizada esta inmovilizada en un soporte sólido se va a requerir de un incremento en la velocidad de agitación; esto para incrementar la transferencia de masa dentro del soporte y reducir la saturación de los poros del soporte con la glicerina producida.

1.6 Procesos de producción de biodiesel

Los procesos convencionales en la producción de biodiesel suelen ser complejos, costosos y generan residuos o subproductos. En comparación, los procesos nuevos utilizan la química verde, evitan el uso de solventes, utiliza eficientemente las materias primas, disminuyen la generación de residuos y evitan el uso de productos tóxicos. La Química Verde es la prevención primaria de la contaminación en lugar de la eliminación de desechos (o soluciones al final del proceso). Se encarga de utilizar eficientemente las materias primas (preferiblemente renovables), eliminando los residuos, y evitando el uso de reactivos y disolventes tóxicos y/o peligrosos en la fabricación y aplicación de productos químicos (Dunn *et al.*, 2010).

1.6.1 Tecnologías verdes para la producción de biodiesel

Las tecnologías que cumplen con los estatutos de procesos nuevos y que utilizan la llamada química verde para prevenir contaminación posterior son:

a) Biocatálisis o biotransformaciones

La biocatálisis, también conocida como catálisis enzimática o biotransformación es el proceso en el cual se emplea un catalizador de origen biológico (como enzimas o células, libres o inmovilizadas), para convertir un sustrato en un producto luego de pasar por un número limitado de etapas. Tiene muchas características atractivas en el contexto de la química verde, ya que las reacciones se realizan generalmente en agua bajo condiciones suaves de temperatura y presión utilizando un catalizador biodegradable compatible con el medio ambiente (una enzima) derivado de materias primas renovables (Dunn *et al.*, 2010).

Las lipasas se usan para catalizar un amplio abanico de reacciones debido a la quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad de las mismas, incluso llevar a cabo reacciones sobre grupos no activos del sustrato que químicamente no serían posibles, destacando también, que las enzimas no producen contaminación medioambiental (Claramunt *et al.*, 2013). La mayoría de las lipasas utilizadas como catalizadores en la química orgánica son de origen microbiano y toleran solventes orgánicos en las mezclas de reacción. Las enzimas catalizan la hidrólisis de triglicéridos inmiscibles en agua en la interfaz agua-líquido. En determinadas condiciones, la cantidad de agua en la mezcla de reacción determinará la dirección de la reacción catalizada por lipasa. Cuando hay poca o ninguna agua, solo se favorecen la esterificación y la transesterificación, sin embargo, la hidrólisis es la reacción favorecida cuando hay exceso de agua (Sharma *et al.*, 2001).

b) Química asistida por ultrasonido

Una onda acústica (sonido) es una propagación de la oscilación de la presión en un medio como el aire o el agua líquida con la velocidad del sonido. El ultrasonido es un sonido inaudible y su frecuencia de oscilación de presión es superior a 20 kHz. Por conveniencia, una onda acústica de más de 10 kHz de frecuencia a veces se denomina onda ultrasónica (Mason, 2011). La utilización de ultrasonido para poder producir reacciones químicas se denomina sonoquímica y consiste en el empleo de

ultrasonido en un medio líquido. El mecanismo que causa efectos sonoquímicos en líquidos es el fenómeno de la cavitación acústica la cual consiste, básicamente, en la formación, crecimiento y colapso implosivo de microburbujas donde se generan altas fuerzas de cizalla originadas por la implosión de las mismas.

La activación química para la sonoquímica se proporciona a través de la energía del colapso de las burbujas de cavitación. La visión más popular de este proceso se incorpora a la llamada teoría del Punto Caliente. Esto implica el concepto de que la burbuja de cavitación colapsa rápidamente de forma violenta y, al hacerlo, genera temperaturas de muchos miles de Kelvin y presiones de varios miles de atmósferas (Mason y Lorimer, 2002). Estas fuerzas de cizallas generadas por este fenómeno son lo suficientemente fuertes como para romper cadenas poliméricas presentes, aunado al aumento de temperatura en el medio, se ve favorecida la reacción química y se acelera la formación de compuestos.

c) Química asistida por microondas

El calentamiento por microondas o el calentamiento dieléctrico es una alternativa al calentamiento conductivo convencional. La irradiación de microondas es un medio de introducir rápidamente energía en un sistema químico de una manera diferente a los métodos tradicionales de calentamiento térmico (Loupy, 2006). El uso de microondas se basa en la capacidad de una sustancia particular (líquida o sólida), como un solvente o sustrato, para absorber la energía de microondas y convertir de manera efectiva la energía electromagnética en calor (energía cinética) (Leadbeater, 2010).

La irradiación de microondas produce un calentamiento interno eficiente (calentamiento volumétrico en el núcleo) mediante el acoplamiento directo de la energía de microondas con las moléculas (disolventes, reactivos, catalizadores) que están presentes en la mezcla de reacción. Dado que los recipientes de reacción empleados a microondas están hechos típicamente de (casi) materiales transparentes, tales como vidrio de borosilicato, cuarzo o teflón, se obtiene un

gradiente de temperatura invertido en comparación con el calentamiento térmico convencional (Kappe, 2004). Un incremento de la energía causa que las moléculas se muevan más rápidamente lo que provoca un mayor número de colisiones energéticamente favorables. Este fenómeno ocurre más rápidamente con la energía microonda, debido a la elevación instantánea de la temperatura de las sustancias, y es por tanto el factor más evidente por el que se observa un aumento de la velocidad de reacción. El empleo de microondas reduce significativamente el tiempo de procesado respecto a las síntesis convencionales, por lo que produce un ahorro energético, tiempos cortos de procesado, la generación de menos subproductos, mayores rendimientos, etc.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto buscó establecer una metodología para la generación de biodiesel a partir del aceite contenido en las semillas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*). La reacción fue una transesterificación alcohólica catalizada por la lipasa de *Candida antártica B* (CAL B) asistida, respectivamente, por irradiación con ultrasonido y microondas. Los datos que se obtuvieron permitieron conocer la cantidad de metilésteres formados en las reacciones de cada uno de los métodos de asistencia en la síntesis. Posterior a la transesterificación se evaluó el rendimiento de metilésteres por medio de cromatografía de gases y se determinaron las energías de activación correspondientes. La Figura 2.1 muestra la metodología general a seguir:

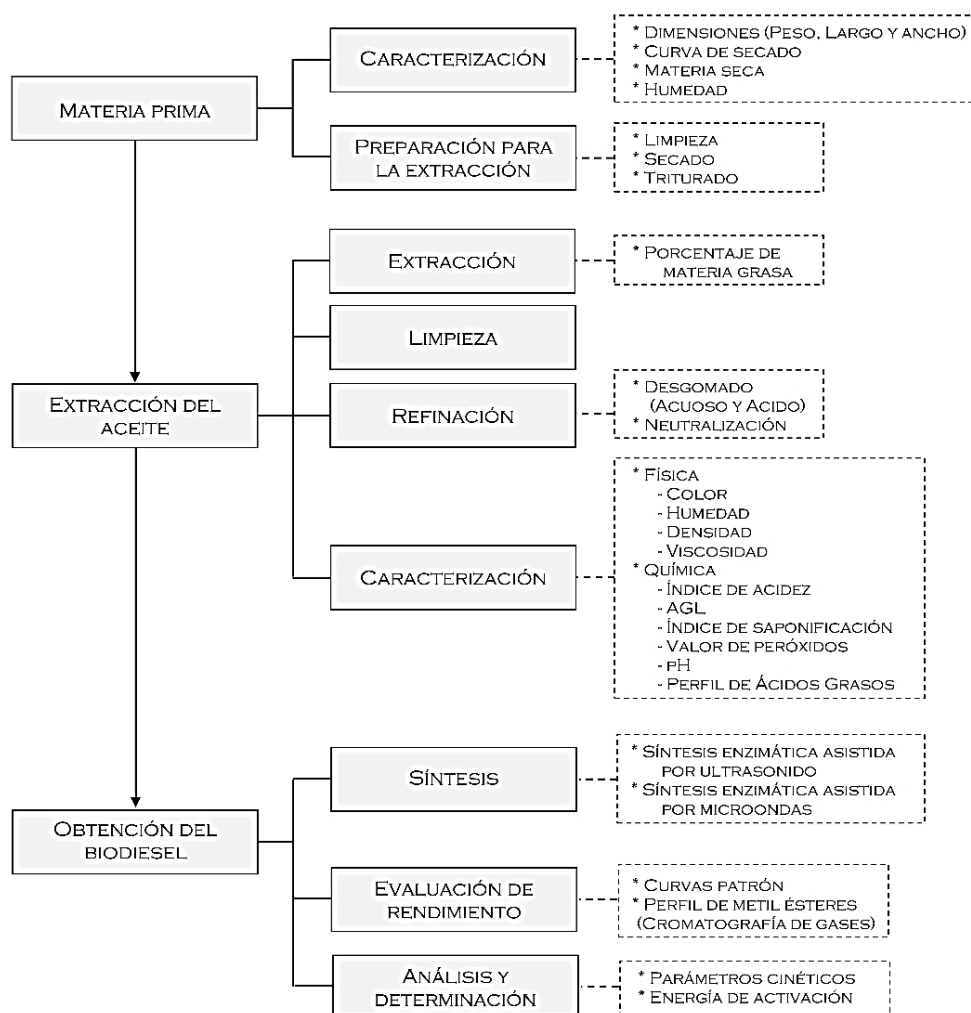


Figura 2.1. Metodología general

2.1 Materia prima

Se emplearon semillas del árbol de *Hevea brasiliensis* de las que se extrajo el aceite para la producción del biodiesel. Las semillas se recolectaron en la localidad de Laguna chica en el municipio de Tezonapa perteneciente al estado de Veracruz.

2.2 Caracterización de la semilla

Se dimensionó la materia prima analizando la forma, tamaño y color de una muestra de semillas. La forma fue determinada por simple inspección y el tamaño se midió utilizando un vernier, los datos se recabaron en tablas para obtener un valor medio y la desviación de las medidas obtenidas de cada semilla. El color de una muestra de semillas se analizó por simple inspección visual y se recabaron los datos.

2.3 Análisis de la materia prima

2.3.1 Curva de secado

Se tomaron muestras de semilla para determinar el tiempo de secado, comparando el porcentaje total de humedad contenido en la semilla fresca con el porcentaje de humedad retirado mediante secado en estufa de flujo convectivo. El secado se realizó en un rango de temperatura entre 100 – 105 °C en intervalos de tiempo (0, 18, 36, 72, 108 y 180 min). La humedad aun contenida en la semilla seca se determinó por el método de termobalanza (NMX-F-428-1982) a una temperatura de 100 °C.

2.3.2 Contenido de humedad y rendimiento de materia seca

Fue determinada la humedad total contenida en la semilla fresca por el método de termobalanza (NMX-F-428-1982) a una temperatura de 100 °C. Se tomaron muestras de semilla y se determinó el rendimiento de materia seca y porcentaje de humedad contenido en las semillas. A cada muestra tomada se le retiró la cáscara que contenía cada una de las semillas. Teniendo las semillas perfectamente peladas, se pesaron estas en una balanza digital (Ohaus – TS400S) tomando el dato del peso

de la semilla húmeda. Las semillas peladas se trozaron en láminas finas y se colocaron en rejillas. Enseguida fueron sometidas a secado en estufa de flujo convectivo (Felisa – FE242A) a una temperatura entre 100 - 105 °C durante un tiempo de 180 min. Posteriormente, se pesaron las semillas secas en una balanza digital (Ohaus – TS400S) tomando el dato del peso de la semilla seca. Finalmente, fue determinado el rendimiento de la materia prima seca y porcentaje de humedad.

Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$\% \text{ MS} = \frac{A}{B} \cdot 100 \quad (2.1)$$

$$\% \text{ H} = \frac{B - A}{B} \cdot 100 = 100 - \% \text{ MS} \quad (2.2)$$

Donde MS es la cantidad de materia seca obtenida (%), H es la cantidad de humedad retirada de las semillas (%), A es el peso de semilla seca (g) y B el peso de semilla húmeda (g).

2.4 Preparación de la materia prima

Previamente a la utilización de las semillas, se realizó una limpieza y descascarillado, para posteriormente cortar las semillas en láminas finas y someterlas a secado en estufa de flujo conectivo (Felisa – FE242A) a una temperatura entre 100 - 105 °C durante 180 min. Finalizado el secado se trituraron en molino para granos manual (Wolfox - WF2541) para obtener un polvo fino facilitando su manipulación y aumentar el área de contacto durante la extracción.

La semilla triturada fue almacenada en frascos con sello hermético, completamente limpios y secos, con la finalidad de evitar que la semilla triturada adquiriera humedad del ambiente.

2.5 Humedad restante

La humedad aun contenida en la semilla seca se determinó por el método de termobalanza (ADAM EQUIPMENT – AMB 50) a partir de la norma NMX-F-428-1982 a una temperatura de 100 °C.

2.6 Extracción del aceite

La extracción del aceite o materia grasa contenida en las semillas se realizó utilizando el método de extracción sólido-líquido, mejor conocido como método Soxhlet. El solvente utilizado para las extracciones del aceite fue hexano (punto de reflujo de 69 °C). Antes de utilizarlo, en caso necesario, se tuvo que purificar utilizando la técnica de destilación simple, la cual fundamentalmente se usa para separar una mezcla de líquidos.

La extracción se llevó a la temperatura de reflujo del solvente y se comparó el rendimiento de aceite obtenido a diferentes tiempos de extracción (1, 2, 3, 4, 5 y 6 h). La relación materia prima / solvente con la cual se realizaron las extracciones para la caracterización fue 1:6 (p/v), es decir, 1 g de semilla triturada por 6 ml de solvente.

El rendimiento de aceite obtenido fue determinado mediante la fórmula 2.3:

$$\% \text{ MG} = \frac{P_2 - P_1}{M} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Donde, MG es la cantidad de materia grasa obtenida (%), P_1 el peso del balón solo (g), P_2 el peso del balón con grasa (g), M es el peso de la muestra seca (g).

2.7 Limpieza del aceite

La micela formada por aceite y el solvente utilizado, se secó agregando Na_2SO_4 anhidro en una relación (p/v) de 0.2 g por cada 50 ml de micela formada, utilizando

una parrilla con agitación (Cimarec – SP131320) durante un tiempo de 30 min con agitación constante. La mezcla formada fue filtrada a presión reducida usando papel filtro, para retirar el Na_2SO_4 anhidro y otras impurezas. El Na_2SO_4 retirado se sometió a secado en estufa de flujo convectivo a una temperatura de 100 °C.

Se procedió a destilar la mezcla a presión reducida utilizando un rotaevaporador (SENCO - R206B) para separar el solvente del aceite. Se debe tener cuidado al usarlo ya que el equipo de concentración utiliza presión a vacío y en ocasiones si no se controlan estos parámetros la muestra puede proyectarse hacia la trampa del rotaevaporador. Para terminar de retirar sólidos, el aceite obtenido fue centrifugado (ClayAdams – CAT No. 0151) a 3200 rpm durante 30 min y temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, se separó el aceite de los sólidos sedimentados por medio de decantación.

En este paso se consideró obtenido el aceite crudo de las semillas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*).

2.7.1 Recuperación del solvente

El solvente extraído quedó para ser purificado mediante el método de destilación simple, ya anteriormente mencionado, separándolo de algún residuo que pudiera existir aun en este y poder ser reutilizado.

2.8 Refinación del aceite

Al aceite obtenido, se le realizó un desgomado para eliminar gomas, fosfolípidos y ceras que pudieran estar contenidas. Se realizaron dos tipos de refinación respectivamente, ácido y acuoso, para posteriormente comparar resultados.

2.8.1 Desgomado ácido

Se calentó el aceite a 40 °C con baja agitación utilizando una parrilla con agitación (Cimarec – SP131320), posteriormente se agregó una solución al 10 % de H_3PO_4 en

una proporción del 5 % de la masa de aceite, se continuo el calentamiento hasta 70 °C durante 30 min y agitación constante. Este método permite remover, tanto las gomas hidratables como las no hidratables.

2.8.2 Desgomado acuoso

El aceite crudo se sometió a calentamiento utilizando una parrilla con agitación (Cimarec – SP131320) hasta alcanzar una temperatura de 60°C, en ese momento se adicionó 3 % (v/v) de agua destilada, la cual debió ser calentada previamente hasta de 60 °C. La mezcla de aceite crudo / agua destilada se dejó con agitación por 30 min a un rango de temperatura entre 60 - 70 °C. Finalizado el tiempo, se dejó enfriar y se centrifugó (ClayAdams – CAT No. 0151) a 3200 rpm durante 30 min para separar el aceite de los sólidos sedimentados por medio de decantación.

El aceite obtenido en la primera etapa se trató con una solución de KCl al 1 % y en una relación muestra (v/v) de aceite / KCl de 98:2, es decir, por cada 98 ml de aceite se añadieron 2 ml de KCl. Se calentó la mezcla con agitación constante a una temperatura entre 60 - 70 °C durante 15 min. Finalmente, se centrifugó (ClayAdams – CAT No. 0151) la mezcla a 3200 rpm durante 30 min para separar el aceite de los sólidos sedimentados por medio de decantación.

2.8.3 Neutralización

El aceite desgomado se mezcló con glicerina en una relación (v/v) aceite/glicerina de 1:3, es decir, por cada ml de aceite se agregaron 3 ml de glicerina para forzar la separación. La mezcla fue sometida a agitación constante por 30 min a presión atmosférica a una temperatura de 120 °C. Transcurridos los 30 min, se transfirió la mezcla a un embudo de separación protegido de la luz por un tiempo de 24 h para la separación de las fases. Finalmente, se llevó la separación las fases formadas (fase superior corresponde al aceite de las semillas del árbol del hule y fase inferior a la glicerina). La fase de aceite obtenida se centrifugó a 3200 rpm durante 30 min para

eliminar los sólidos que pudiese tener y la glicerina aun existente, separando por decantación.

Se verificó el pH del aceite, el cual debía encontrarse entre 7 - 9. En caso de encontrarse fuera del rango (generalmente ácido), se realizó un tratamiento alternativo que permitió la disminución de la acidez del aceite. La neutralización se realizó utilizando una razón (p/v) aceite / NaOH teniendo que, por 200 g de aceite adicionar 5 ml de una solución de NaOH al 10 %, dejándola en reposo durante un tiempo de 20 min. Luego, el aceite se separó del jabón producido por centrifugación (ClayAdams – CAT No. 0151) durante 30 min a 3200 rpm. El aceite fue sometido a secado en estufa de flujo convectivo (Felisa – FE242A) a una temperatura de 120 °C durante 2 h para eliminar el agua que pudiera quedar. Transcurrido este tiempo se midió nuevamente el pH del aceite. Se consideró obtenido el aceite refinado de las semillas del árbol del hule.

2.9 Caracterización físico-química del aceite

Se caracterizó el aceite obtenido mediante las Normas Mexicanas (Tabla 2.1):

Tabla 2.1. Análisis para control de la calidad del aceite

Análisis	Propiedad	Prueba
Físico	Humedad y materia volátil	NMX-F-211-1987
	Densidad	---
Químico	Índice de refracción	Refractómetro tipo ABBE
	AGL	NMX-F-101-SCFI-2012
	Índice de saponificación	NMX-F-174-S-1981
	Valor de peróxidos	NMX-F-154-1987
	pH	Potenciómetro
	Perfil de ácidos grasos	Cromatografía de gases (Agilent Technologies - 6820 GC System)

2.10 Obtención del biodiesel

Se realizó la reacción de transesterificación utilizando los métodos de asistencia mediante el diseño de experimentos planteado considerando las variables que afecten la reacción. Los métodos de asistencia planteados para las reacciones fueron síntesis enzimática asistida por ultrasonido y síntesis enzimática asistida por microondas.

2.10.1 Reacción de transesterificación

Para la reacción de transesterificación se seleccionaron 2 parámetros constantes considerando la cantidad de aceite por experimento y la relación aceite / alcohol (v/v); y 3 variables que influían en la reacción siendo la relación de aceite /enzima, tiempo de reacción y temperatura de reacción.

Como parámetros establecidos se manejaron la cantidad de aceite siendo de 1 g y la relación aceite/alcohol siendo de 1:4.

En la Tabla 2.2 se muestran las condiciones de operación utilizadas en el diseño experimental Box Behnken de tres variables para el sistema de reacción:

Tabla 2.2. Factores y niveles del diseño experimental

Factores		Niveles		
		-1	0	1
Enzima (g)		0.05	0.075	0.1
Temperatura (°C)		50	55	60
Tiempo (min)	Ultrasonido	30	60	90
	Microondas	15	30	45
	Convencional	120	240	360

La cantidad de aceite, metanol y enzima CAL B establecidas en el sistema se pesaron en una balanza analítica (Sartorius – TE214S), considerando la cantidad requerida por cada experimento. La reacción de transesterificación se llevó mezclando en un vial con capacidad de 30 ml y se inició la agitación por el método de asistencia correspondiente, comenzando a contar el tiempo de reacción.

2.10.2 Separación

La mezcla de biodiesel, metanol y glicerina obtenida en el proceso de transesterificación se transfirió a un frasco pequeño de 10 ml dejando en reposo durante 24 h para la separación de las fases. Transcurrido el tiempo, la fase superior (metilésteres y metanol) obtenida se separó de la fase inferior (glicerol).

2.10.3 Purificación

Se destiló la mezcla obtenida de metilésteres / metanol a presión reducida para retirar el metanol residual.

2.11 Evaluación del rendimiento del biodiesel

2.11.1 Curvas patrón

Se realizaron curvas patrón para cuantificar el rendimiento de metilésteres presentes en los experimentos de cada uno de los diseños experimentales realizados.

Se preparó una solución madre para cada uno de los estándares disolviendo 0.1 g de estándar de ácidos grasos (ácido palmítico, esteárico y oleico), así como de metilésteres (metil palmitato, estearato y oleato), respectivamente en frascos separados adicionando 1 ml de hexano para disolverlos. Se obtuvieron soluciones patrón con diferentes concentraciones conocidas (mg/ml).

Utilizando del método de cromatografía de gases se inyectaron 2 µl de cada serie de estándar preparado en un cromatógrafo Agilent 6820, obteniendo el área de cada

concentración de estándar inyectada. Posteriormente, se graficaron las áreas obtenidas de cada estándar contra los mg que representaba cada inyección. Además, utilizando la fórmula de mínimos cuadrados se determinó la función continua para un ajuste lineal de los datos de cada gráfica.

$$y = a \cdot x + b \quad (2.4)$$

Donde “y” es valor proyectado, estimado o pronóstico de las áreas obtenidas, “a” es la pendiente de la recta, “x” es el valor estimado de miligramos en cada área (mg) y “b” es el punto donde la recta corta el eje. Para calcular los valores de a y b se utilizó:

$$a = \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad b = \frac{(\sum y_i) - a(\sum x_i)}{n}$$

2.11.2 Perfil de metilésteres

El biodiesel obtenido se analizó para determinar el tipo, el contenido de metilésteres y la pureza de cada experimento de acuerdo con el método de cromatografía de gases. El análisis se realizó disolviendo el biodiesel en 1 ml de hexano, de la mezcla se tomó una muestra de 2 µl para analizar su composición mediante cromatografía de gases. Las condiciones de uso del cromatógrafo (Agilent Technologies - 6820 GC System) fueron:

- Horno: Iniciar a una temperatura de 40 °C por medio minuto, incrementar 25 °C/min hasta 195 °C, enseguida 3 °C/min hasta 205 °C y finalizar con un incremento de 8 °C/min hasta 230 °C manteniendo por 20 minutos.
- Inyector Frontal tipo SPLIT/SPLITLESS: Temperatura de 250 °C
- Columna 1 HP-INNOWAX: Temperatura máxima de 310 °C, longitud nominal de 30 m, diámetro nominal 320 µm y grosor de la película de 0.5 µm.
- Detector Frontal (TCD): Temperatura de 250 °C y gas auxiliar Helio.

Con el cromatograma obtenido para cada experimento sobre su composición, se determinó la cantidad de metilésteres comparando este con las curvas patrón para cada uno de los ácidos grasos tomando en consideración la cantidad de ácidos grasos sin reaccionar al finalizar la reacción. El rendimiento de biodiesel se calculó de acuerdo a la fórmula 2.5:

$$\% \text{ Biodiesel} = \frac{AG}{AG + ME} \cdot 100 \quad (2.5)$$

Donde AG es la cantidad de ácidos grasos restantes de la reacción (mg) y ME es la cantidad de metilésteres formados de la reacción (mg).

2.12 Análisis y determinación de parámetros cinéticos

2.12.1 Cinética de reacción

Se seleccionó un experimento de cada método de asistencia utilizado (ultrasonido y microondas) que presentó el mejor rendimiento con respecto a la cantidad de metilésteres. A cada uno de los experimentos se les realizó la cinética de avance de reacción a las condiciones marcadas de enzima y temperatura, las muestras fueron tomadas a diferentes tiempos de reacción con el fin de obtener 5 puntos en la cinética.

El orden y la constante de reacción de la cinética establecida se determinó mediante el método de las concentraciones iniciales, donde teniendo una idea de la dependencia funcional de la ecuación de velocidad se puede determinar la constante de velocidad a partir de medidas de la concentración de las especies a lo largo del tiempo ajustando los pares de valores ($[A]_t$, t) a la forma funcional de la ecuación integrada reduciendo la ecuación a un ajuste lineal. En la Tabla 2.3 se puede observar las ecuaciones a partir de las cuales se linealizaron las cinéticas obtenidas:

Tabla 2.3. Ecuaciones de velocidad integradas

Orden de reacción	Ecuación integral	$y = a \cdot x + b$			
		y	a	x	b
0	$[A] = [A]_0 - k t$	$[A]$	t	$-k$	$[A]_0$
1	$\ln[A] = \ln[A]_0 - k t$	$\ln[A]$	t	$-k$	$\ln[A]_0$
2	$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k t$	$\frac{1}{[A]}$	t	$+k$	$\frac{1}{[A]_0}$

2.12.2 Cálculo de energía de activación de la reacción

Para relacionar la velocidad de una reacción con la temperatura se utilizó la ecuación de Arrhenius expresada como:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (2.6)$$

Donde K es la constante de velocidad, A es el factor de frecuencia de las colisiones entre las moléculas reactivas, E_a es la energía de activación (J/mol), R es la constante de los gases (J/mol K) y T es la temperatura absoluta (K).

Aplicando el logaritmo natural a la ecuación de Arrhenius se obtuvo la misma ecuación pero linealizada la cual fue utilizada para calcular la energía de activación de los experimentos planteados.

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.7)$$

De esta manera, la gráfica de $\ln(k)$ contra $(1/T)$, da lugar a una línea recta (Tabla 2.4):

Tabla 2.4. Ecuación de Arrhenius linealizada expresada en términos lineales como $y = a \cdot x + b$

$y = a \cdot x + b$			
y	a	x	b
ln(k)	$-\frac{E_a}{R}$	$\frac{1}{T}$	ln(A)

Considerando el mejor experimento obtenido de cada método de asistencia, a cada uno se le realizó el procedimiento siguiente:

Procedimiento general

1. El factor enzima fue fijado de acuerdo a las condiciones establecidas por cada experimento, teniendo que la temperatura a la que se realizó cada reacción fue 55, 60 y 65 °C.
2. Se realizaron cinéticas de reacción tomando muestras a diferentes tiempos con el fin de obtener 5 puntos en la cinética, considerando que el punto final fuera tomado al tiempo marcado por las condiciones establecidas por cada experimento.
3. Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases para obtener el rendimiento de metilésteres a cada tiempo de muestreo.
4. El orden y la constante de reacción de cada cinética se determinó mediante las ecuaciones de velocidad integradas.
5. Una vez obtenida la constante de cada cinética a las diferentes temperaturas establecidas, mediante el modelo de regresión lineal de la ecuación de Arrhenius se determinó el valor de la energía de activación para cada uno de los experimentos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se reportan los resultados obtenidos en la extracción del aceite contenido en las semillas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*); así como, en la síntesis enzimática de biodiesel asistida por irradiación con microondas y ultrasonido. Las semillas fueron recolectadas en la localidad de Laguna chica en el municipio de Tezonapa perteneciente al estado de Veracruz.

Los árboles presentaban una altura aproximada de entre 10 a 15 m (Figura 3.1). Toda la experimentación se efectuó en las instalaciones del Instituto Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Orizaba.



Figura 3.1. Lugar de recolección de las semillas de *Hevea brasiliensis*, Laguna chica, Tezonapa, Veracruz

3.1 Caracterización de la semilla

3.1.1 Forma y tamaño

Los frutos del árbol de hule (*Hevea brasiliensis*) son una capsula de tres cavidades conteniendo una semilla en cada celdilla. Las semillas del árbol de *Hevea brasiliensis* presentan forma ovoide con una cubierta de color café y manchas café oscuro y negro.

Se realizó un muestreo para determinar si la longitud de las semillas y el peso total de las mismas era similar al reportado en trabajos previos, donde ya se ha caracterizado este. En la Figura 3.2 se observa que las semillas presentan tres secciones: altura, sección ancha (largo) y sección delgada (ancho).



Figura 3.2. Tamaño de la semilla del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*)

El peso promedio de las semillas con cubierta o cáscara es de 5.21 ± 0.41 g y una media en sus dimensiones de 2.753 ± 0.05 cm de alto, 1.808 ± 0.05 cm de ancho y 2.394 ± 0.09 cm de largo.

La semilla sin cubierta presenta un peso promedio de 3.44 ± 0.34 g y dimensiones medias de 2.375 ± 0.09 cm de largo, 1.4055 ± 0.03 cm de ancho corto y 1.884 ± 0.10 cm de ancho largo. Durante el proceso de descascarillado el peso de la semilla fresca se reduce un 33.97 % del peso total.

3.1.2 Curva de secado y humedad restante

El análisis para determinar el porcentaje de humedad en la semilla fresca mediante el uso de termobalanza a una temperatura de 100 °C muestra que tiene una humedad total de 41.33 %.

El porcentaje de humedad restante en la semilla fue medido por el método de la termobalanza obteniendo la curva de humedad restante mostrada en la Figura 3.3.

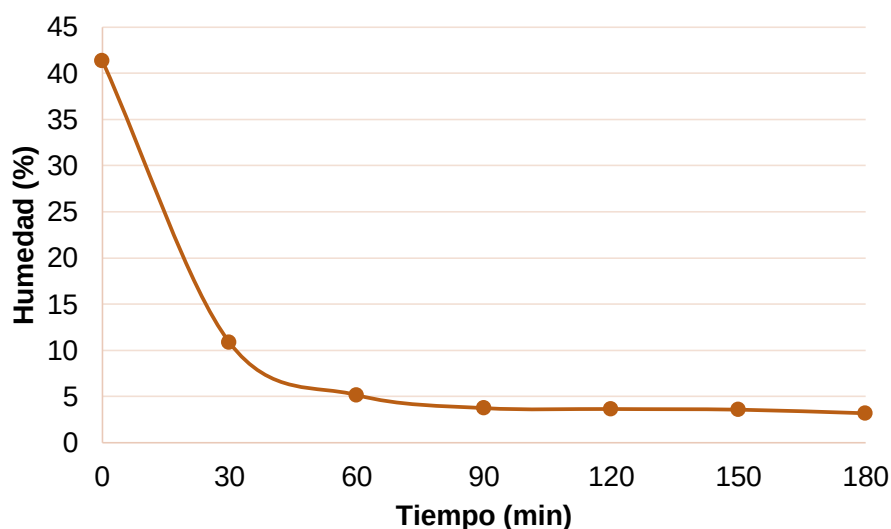


Figura 3.3. Porcentaje de humedad restante contenido en las semillas de *Hevea brasiliensis*

En la curva de secado se observa que el porcentaje de humedad retirada de las semillas después de 180 min de secado fue de 38.25 %. La curva de humedad restante muestra que a partir de los 120 min el porcentaje de humedad aun contenido en la semilla fue de 3.65 %, en comparación, a los 180 min donde se redujo hasta 3.19 %. Por lo tanto, se determinó que las condiciones idóneas de secado para la semilla de *Hevea brasiliensis* son durante 180 min en un rango de temperatura de 100 – 105 °C. El porcentaje de humedad restante promedio en la materia seca fue determinado utilizando una termobalanza a la temperatura de 100 °C, el resultado obtenido fue de 3.03 ± 0.13 % de humedad en base seca. Por lo que el 59.9 % del total del peso de la semilla es la materia seca obtenida que puede ser utilizada para la extracción de aceite.

3.1.3 Rendimiento de materia seca

El porcentaje de materia seca presente en las semillas de *Hevea brasiliensis* corresponde a un promedio de 61.75 ± 0.22 %, por lo que, el 38.25 ± 0.22 % fue el porcentaje de humedad retirado mediante el secado a las condiciones establecidas en el análisis. En la Figura 3.4 se puede observar la comparación de seis muestras de semillas.

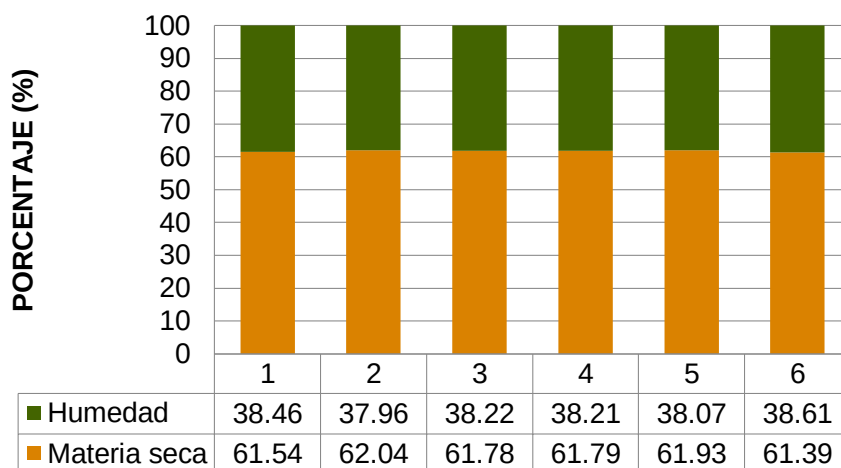


Figura 3.4. Comparación de los porcentajes de materia seca y humedad presentes en las muestras de semilla

3.2 Extracción de aceite

El solvente utilizado en las extracciones fue n-hexano a su temperatura de reflujo siendo de 69 °C. En la Figura 3.5 se presenta la comparación del porcentaje de materia grasa obtenido a tiempos de extracción de 1 a 6 h.

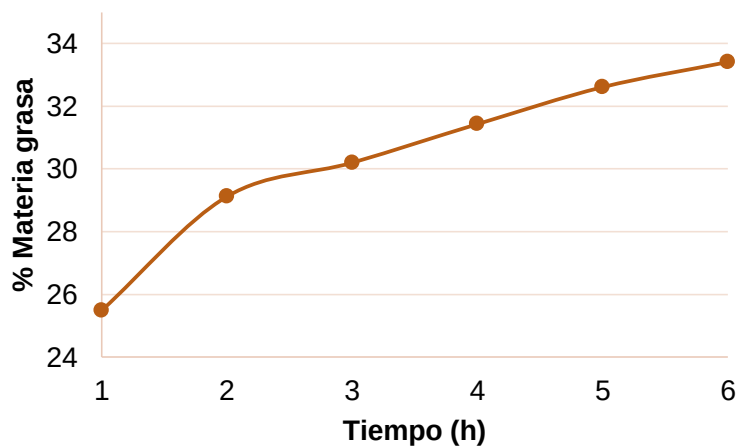


Figura 3.5. Porcentajes de materia grasa (MG) a diferentes tiempos de extracción y una temperatura de 69 °C

La extracción se realizó durante un tiempo de 4 horas obteniendo un rendimiento promedio de materia grasa cruda de 31.02 ± 0.34 %. Para la refinación del aceite crudo obtenido de las semillas de *Hevea brasiliensis* se compararon por triplicado dos métodos de refinación, teniendo el desgomado acuoso (agua destilada y cloruro de potasio) y el desgomado ácido (ácido fosfórico).

En la Figura 3.6 se observa la comparación de rendimientos de materia grasa, así como, la disminución después del proceso de refinado:

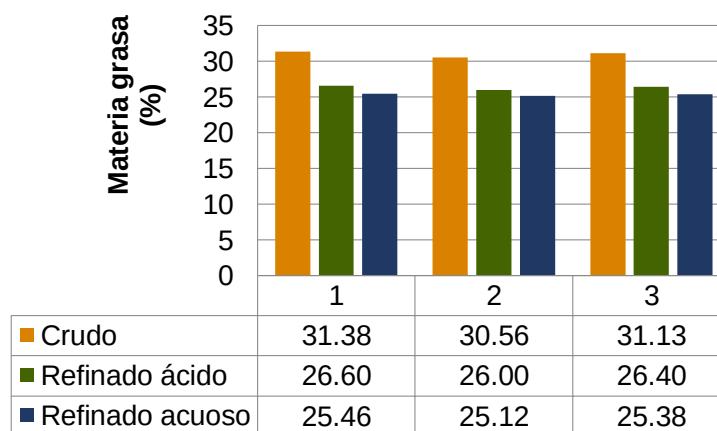


Figura 3.6. Comparación del rendimiento de materia grasa

Se puede observar que el mejor rendimiento en cuanto a materia grasa obtenida se da después de utilizar el método de refinado ácido con un 26.33 ± 0.25 %, en comparación con el refinado acuoso con el que se obtiene un 25.32 ± 0.15 % de materia grasa final.

3.2.1 Caracterización de aceite

La caracterización del aceite, tanto crudo como con refinado (acuoso y ácido), se determinó mediante Normas Mexicanas en aceites y grasas vegetales o animales. Los resultados obtenidos en dichas pruebas se presentan en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Caracterización del aceite crudo y refinado obtenido de las semillas de *Hevea brasiliensis*

Análisis	Propiedad	Prueba	Especificaciones para aceites vegetales		Este estudio			Onoji et al., (2016)	Panichikhal et al., (2018)
			Mínimo	Maximo	Aceite Crudo	Refinado Acuoso	Refinado Acido	Aceite Crudo	Aceite Crudo
Físico	Tipo de clon		---		RRIM 527			NIG800	RRII 105
	Materia grasa (%)	Método Soxhlet	---	---	31.02 ± 0.34	25.32 ± 0.15	26.33 ± 0.25	43 ± 0.141	39.5
	Estado físico a 25 °C	---	---	---	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido
	Estado físico a 4 °C	---	--	---	Sólido	Sólido	Sólido	---	---
	Color	---	---	30A - 3.5R (escala Lovibond)	Amarillo oscuro	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Café oscuro	Amarillo oscuro
	Humedad y materia volátil (%)	NMX-F-211-1987	---	0.05	0.35	0.22	0.26	1.73 ± 0.028	1.75 ± 0.45
	Densidad (g/ml)	---	0.915	0.920	0.9117	0.9023	0.9112	0.886 ± 0.002	0.854
	Viscosidad (poises)	---	---	---	25.1127	27.1984	25.1668	---	38.46
Químico	Índice de refracción	Refractómetro	1.467	1.469	0.1477	0.1476	0.1476	1.4707 ± 0.00028	---
	Índice de acidez	NMX-F-101-1987	< 60		4.76	2.24	3.78	---	---
	AGL (oleico) (%)	NMX-F-101-SCFI-2012	---	0.05	2.39	1.12	1.89	---	---
	Índice de saponificación	NMX-F-174-S-1981	< 400		237.95	231.94	233.72	195.30 ± 0.282	192.36
	Valor de peróxidos (meq/kg)	NMX-F-154-1987	---	1.0	19.91	11.99	7.92	10.46 ± 0.098	---
	pH	Potenciómetro	---	---	7	6	7	6 ± 0.141	6.14

El rendimiento y características del aceite proveniente de las semillas de *Hevea brasiliensis* pueden variar dependiendo del tipo de clon, la técnica de extracción, tipo de solvente utilizado y condiciones de operación aplicadas. En el trabajo actual y los presentados, la extracción de materia grasa contenida en las semillas se realizó

mediante el método Soxhlet a diferentes condiciones de operación considerando un rango de 1 a 4 horas de extracción, lo que indica que la diferencia en porcentaje obtenido de materia grasa es debida al tipo de clon utilizado en cada investigación.

3.3 Rendimiento de Metilésteres

Para determinar el rendimiento en cada reacción de transesterificación se realizó la cuantificación del contenido de AG presentes en el aceite de la semilla de *Hevea brasiliensis* y los metil ésteres formados, por lo que se consideraron las composiciones típicas presentes en el aceite obtenido de la semilla del árbol del hule. Los ácidos grasos comunes informados en diversos artículos son: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y α -linolénico (C18:3). Otros tipos de AG pueden estar presentes en el aceite, pero en proporciones más pequeñas.

3.3.1 Determinación del contenido de AG

Los tiempos de retención determinados para este estudio considerando los principales AG presentes en el aceite de semilla de *Hevea brasiliensis* se muestran en la Tabla 3.2, los cuales se obtuvieron mediante el análisis por cromatografía de gases de cada uno de los estándares puros:

Tabla 3.2. Tiempos de retención determinados en columna DB-5 de los principales AG

Ácido Graso	Tiempo de retención (min)
Palmítico (C16:0)	16.908 $\pm$ 0.08
Linoleico (C18:2 n-6)	22.071 $\pm$ 0.02
Oleico (C18:1)	22.152 $\pm$ 0.10
α -Linolénico (C18:3)	22.301 $\pm$ 0.02
Esteárico (C18:0)	22.561 $\pm$ 0.21

En la Figura 3.7 se presenta el cromatograma obtenido con la identificación de los AG principales presentes en una muestra de aceite considerando los tiempos de retención de cada estándar puro analizado:

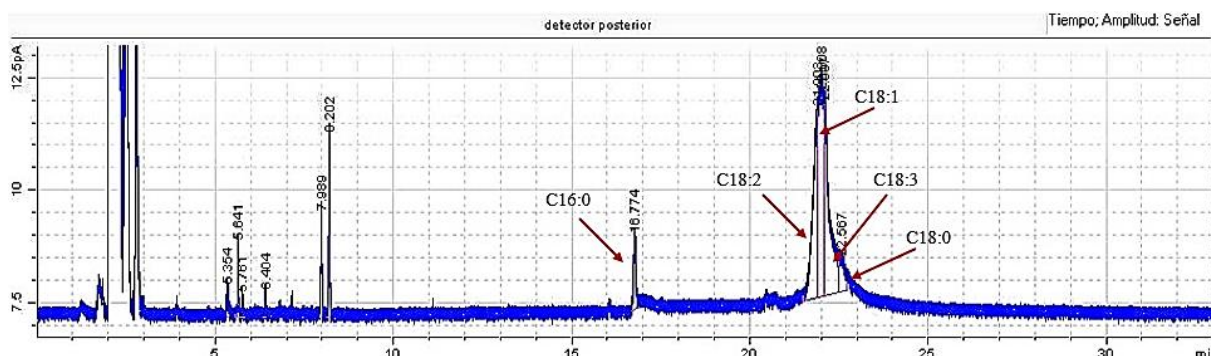


Figura 3.7. Cromatograma e identificación de AG en el aceite de *Hevea brasiliensis*

Con los tiempos de retención establecidos y las áreas generadas en el análisis utilizando cromatografía de gases a partir del aceite desgomado de la semilla de *Hevea brasiliensis*, en la Tabla 3.3 se muestran los porcentajes determinados de cada AG, los cuales se comparan con diversos autores.

El porcentaje general de ácidos grasos obtenidos en este trabajo (palmítico, linoleico, oleico) se encuentra por debajo del obtenido con otras semillas de la misma especie *Hevea brasiliensis*. Sin embargo, el ácido α -Linolénico presenta el mayor contenido con un 30 %, siendo mucho mayor en el tipo de clon RRIM 527; lo cual puede indicar que al existir una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en el aceite, el biodiesel obtenido a partir de este podría tener un valor bajo en el índice de cetano lo que se traduce en un aumento en el tiempo de inducción del biodiesel en el motor.

Los valores presentados pueden ser diferentes según el tipo de clon, la ubicación geográfica y condiciones de crecimiento del árbol de hule que se utilizó en cada estudio, así como, los procesos de extracción y los métodos analíticos utilizados. La comparación sobre los métodos utilizados en algunos estudios se presenta en la Tabla 3.4.

Tabla 3.3. Composición de AG en el aceite de *Hevea brasiliensis* (%)

Ácido Graso	Trabajo actual	Kittigowittana <i>et al.</i> (2013)		Ramadhas <i>et al.</i> , (2005)	Onoji <i>et al.</i> , (2016)
		Aceite 1	Aceite 2		
Palmítico (C16:0)	5.25	8.78 ± 0.05	8.94 ± 0.05	10.2	0.23 – 10.6
Linoleico (C18:2)	27.66	42.13 ± 0.06	40.81 ± 0.29	39.6	39.6 – 52.84
Oleico (C18:1)	30.81	38.96 ± 0.36	42.08 ± 0.10	24.6	12.7 – 42.08
α-Linolénico (C18:3)	30.23	2.38 ± 0.00	No detectable	16.3	2.38 – 26
Esteárico (C18:0)	6.05	6.17 ± 0.16	5.69 ± 0.11	8.7	5.69 – 12

Tabla 3.4. Métodos utilizados en la determinación de la composición de AG en el aceite de *Hevea brasiliensis*

Característica	Trabajo actual	Kittigowittana <i>et al.</i> (2013)	Ramadhas <i>et al.</i> , (2005)	Onoji <i>et al.</i> , (2016)
Tipo de Clon	RRIM 527	RRIM 600	No menciona	No menciona
Ubicación geográfica	Tezonapa, Veracruz	Provincias de Chiang Rai y Surin, Tailandia	India	Kampung Pandan, Kuantan, Pahang, Malaysia
Método de extracción	Soxhlet a 69°C durante 4 h	Temperatura ambiente durante 24 h	Trituración de la semilla	Microondas durante 30 min a 64 °C
Método analítico	Análisis de AG por CG	Análisis de metilésteres por CG	No menciona	Espectroscopía de masas por cromatografía de gases (GC-MS)

3.3.2 Determinación del contenido de metilésteres

En la identificación y cuantificación del rendimiento en la reacción de transesterificación se consideraron únicamente tres de los metilésteres de los AG mencionados debido a los estándares utilizados. En la Tabla 3.5 se muestran los metilésteres y los tiempos de retención identificados de cromatogramas obtenidos mediante estándares.

Tabla 3.5. Tiempos de retención de los metilésteres

Metiléster	Tiempo de retención (min)
Palmitato	16.075 ± 0.003
Oleato	20.632 ± 0.003
Estearato	21.344 ± 0.01

El rendimiento de biodiesel obtenido en las reacciones se calculó en base a los metilésteres formados en relación a la cantidad de AG restantes al finalizar cada reacción. Para la cuantificación respectivamente de AG y metilésteres se realizaron curvas patrón preparando una serie de diluciones de los estándares correspondientes a diferentes concentraciones. En las Figura 3.8 se muestran las curvas patrón para AG y, respectivamente, las Figura 3.9 presentan las correspondientes a los metilésteres seleccionados.

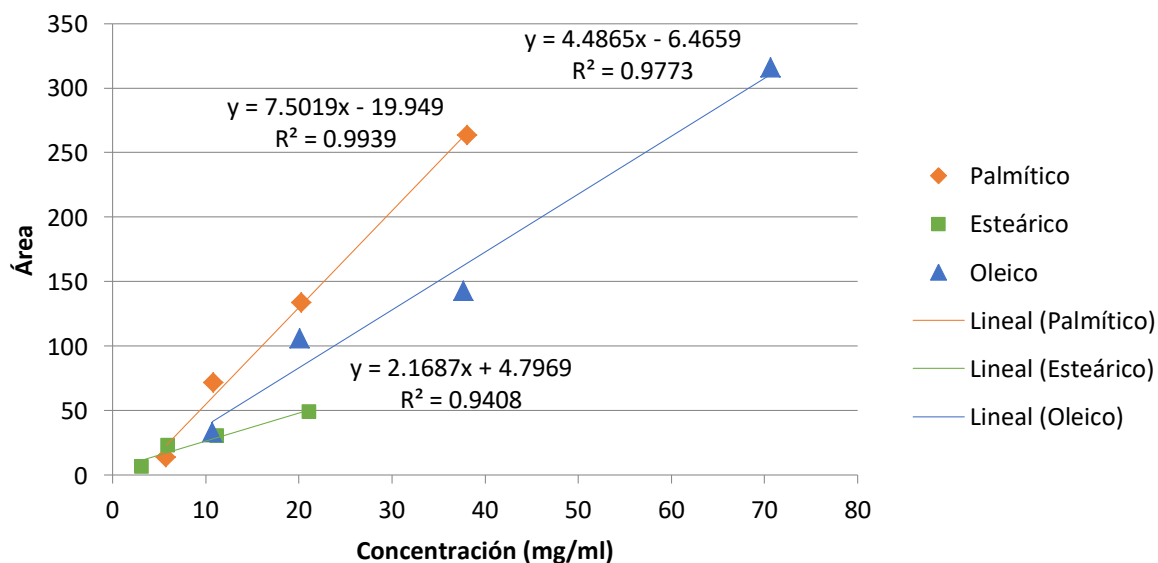


Figura 3.8. Curvas patrón para los ácidos palmítico, esteárico y oleico

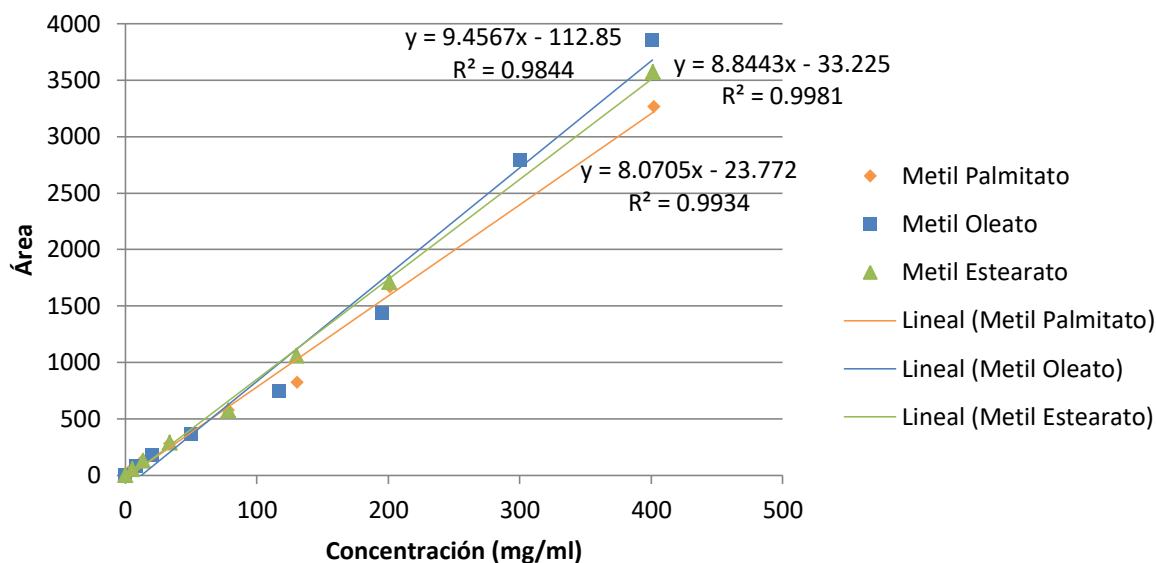


Figura 3.9. Curvas patrón para los metil palmitato, estearato y oleato

3.3.3 Análisis del rendimiento de metilésteres

El análisis para ambos diseños Box-Behnken (ultrasonido y microondas) se obtuvo mediante el software Minitab, considerando el rendimiento a partir de los datos experimentales para cada diseño. El diseño utilizado (Box-Behnken) permite la optimización del proceso de transesterificación obteniendo las mejores condiciones para este proceso y el máximo rendimiento de metilésteres.

A. Reacción de transesterificación asistida por Microondas

La Tabla 3.6 muestra los rendimientos de los experimentos descritos en el diseño utilizado para la reacción de transesterificación asistida por microondas. El experimento que presenta mejor rendimiento en la obtención de metilésteres es el número 6 realizado con 1 g de aceite, 0.1 g de enzima, durante 30 min a una temperatura de 50 °C.

Tabla 3.6. Rendimiento de esteres metílicos por el método de microondas

Orden Estadístico	Enzima (g)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Variables codificadas			Rendimiento (%)
				Enzima (g)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
1	0.05	15	55	-1	-1	0	32.65
2	0.1	15	55	1	-1	0	38.15
3	0.05	45	55	-1	1	0	34.47
4	0.1	45	55	1	1	0	44.81
5	0.05	30	50	-1	0	-1	61.53
6	0.1	30	50	1	0	-1	61.54
7	0.05	30	60	-1	0	1	37.71
8	0.1	30	60	1	0	1	32.69
9	0.075	15	50	0	-1	-1	41.11
10	0.075	45	50	0	1	-1	55.33
11	0.075	15	60	0	-1	1	49.59
12	0.075	45	60	0	1	1	40.23
13	0.075	30	55	0	0	0	42.94
14	0.075	30	55	0	0	0	48.01
15	0.075	30	55	0	0	0	44.52

El cromatograma correspondiente al experimento con mayor rendimiento de metilésteres obtenidos se presenta en la Figura 3.10 logrando observar los AG sin reaccionar y los metilésteres formados en la reacción de transesterificación.

En el análisis de varianza para los rendimientos de metilésteres utilizando como método de asistencia en la reacción de transesterificación las microondas (Tabla 3.7) ninguno de los factores principales, sus interacciones entre ellos o las interacciones de los efectos cuadráticos mostraron diferencia significativa ($p < 5$), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0 %.

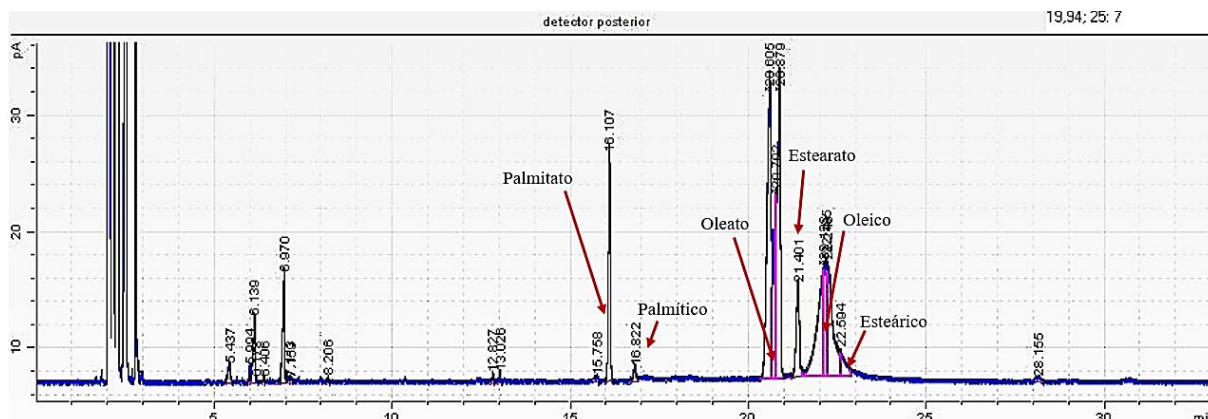


Figura 3.10. Cromatograma del experimento 6

El coeficiente de determinación (R^2) tiene un valor de 72.91 % ($R^2 \leq 80$), estando considerado como no fiable para modelar datos con alta precisión para proponer variables.

En el análisis de varianza para los rendimientos de metilésteres utilizando como método de asistencia en la reacción de transesterificación las microondas (Tabla 3.7) ninguno de los factores principales, sus interacciones entre ellos o las interacciones de los efectos cuadráticos mostraron diferencia significativa ($p < 5$), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0 %. El coeficiente de determinación (R^2) tiene un valor de 72.91 % ($R^2 \leq 80$), estando considerado como no fiable para modelar datos con alta precisión para proponer variables.

La Figura 3.11 muestra el diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento por metilésteres obtenidos. Se puede observar de manera gráfica, que no existe significancia entre los factores principales (A:Enzima, B:Tiempo y C:Temperatura) y sus interacciones, es decir ninguno de estos presenta gran influencia sobre la variable de respuesta. La Temperatura se puede considerar como el único factor que podría ser levemente considerable.

Tabla 3.7. Análisis de varianza para rendimiento por metilésteres por el método de microondas

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Enzima	14.6611	1	14.6611	0.22	0.6594
B:Tiempo	22.2444	1	22.2444	0.33	0.5892
C:Temperatura	439.413	1	439.413	6.57	0.0505
AA	31.4192	1	31.4192	0.47	0.5236
AB	5.8564	1	5.8564	0.09	0.7792
AC	6.32522	1	6.32522	0.09	0.7709
BB	82.2442	1	82.2442	1.23	0.3180
BC	139.004	1	139.004	2.08	0.2090
CC	138.651	1	138.651	2.07	0.2095
Error total	334.514	5	66.9028		
Total (corr.)	1234.75	14			

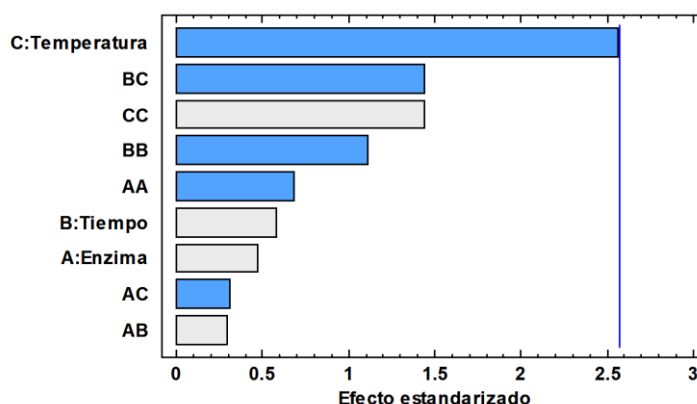


Figura 3.11. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de metilésteres utilizando microondas

La Figura 3.12 muestra la gráfica Mitad-Normal para el rendimiento por metilésteres de acuerdo a la desviación estándar que presenta cada uno de los factores y sus interacciones, teniendo que al ser ajustados no muestran gran variación encontrándose cerca de la recta de ajuste. Se demuestra que existe una correlación adecuada garantizando que la experimentación se realizó de manera adecuada y aleatoriamente.

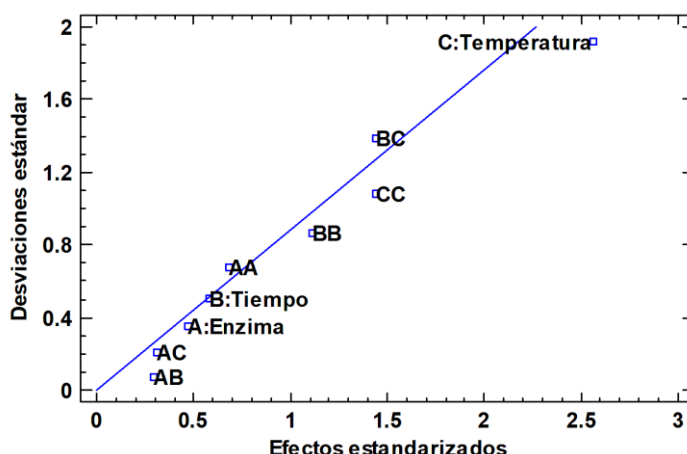


Figura 3.12. Gráfica Mitad-Normal para el rendimiento por metilésteres

La Ecuación 3.1 muestra el polinomio de regresión de segundo orden obtenido mediante el análisis de los experimentos realizados utilizando como método de asistencia las microondas:

Rendimiento

$$\begin{aligned}
 &= 651.702 + 1210.75 * E + 5.45072 * Ti - 25.3326 * Te - 4667.33 * E^2 \\
 &+ 3.22667 * E * Ti - 10.06 * E * Te - 0.0209759 * Ti^2 - 0.0786 * Ti * Te \\
 &+ 0.245117 * Te^2
 \end{aligned} \quad (3.1)$$

De manera gráfica en la Figura 3.13 y Figura 3.14 se muestran las representaciones de los gráficos de superficie de respuesta estimada y contornos de la superficie de respuesta para las interacciones de los parámetros utilizados en el diseño experimental, obtenidas mediante el software Minitab. De forma gráfica se demuestra que existe un máximo local en la interacción Enzima-Tiempo, obteniendo una región en la cual se logran observar que los valores más altos de rendimiento para la reacción de transesterificación se encuentran en la esquina superior derecha de la gráfica, que coincide con los valores superiores al valor medio de los parámetros Tiempo y Enzima. En la gráfica de contorno las interacciones Tiempo- Temperatura y Enzima-Temperatura presentan un punto de silla, ya que se observa que hay un punto sobre la superficie de las gráficas en el que la elevación es máxima en una dirección y mínima en la dirección perpendicular.

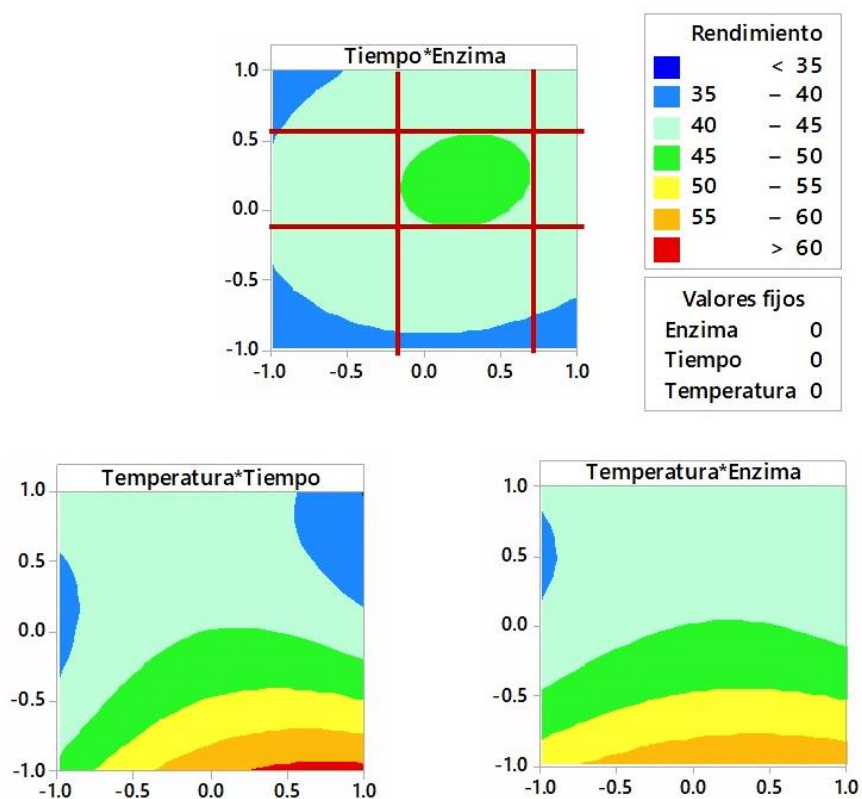


Figura 3.13. Gráfico de superficie de respuesta estimada por el método de microondas

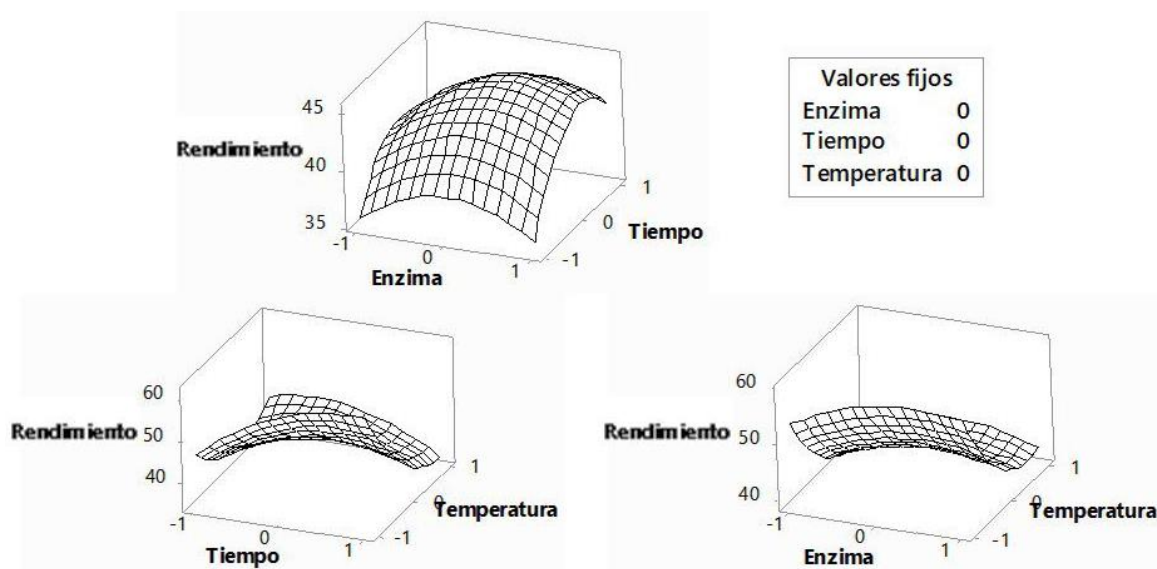


Figura 3.14. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta por el método de microondas

La Tabla 3.8 muestra la combinación de los niveles (mínimo y máximo) de los factores, teniendo además los valores óptimos de cada factor que maximizaran el rendimiento obtenido de metilésteres.

El valor óptimo de rendimiento de biodiesel a partir de los metilésteres obtenidos usando la optimización del software Minitab se presentan con un tiempo de 43 min, 0.09 g de lipasa CAL B y una temperatura de 50 °C obteniendo un rendimiento máximo de 62.85 %.

Tabla 3.8: Optimización de la respuesta utilizando el método de microondas

Factor	Bajo	Alto	Optimo
Enzima (g)	0.05	0.1	0.0907751
Tiempo (min)	15.0	45.0	43.2329
Temperatura (°C)	50.0	60.0	50.0

La apariencia de las superficies obtenidas mediante reacción de transesterificación asistida por microondas se debe a que los puntos óptimos del proceso, se dan a temperaturas por encima de los 60 °C, las cuales no son viables en el proceso debido a que superan el punto de ebullición del metanol y comprometen la estructura molecular del aceite. Las condiciones propuestas por el software Minitab y comprobadas por el procesamiento de las ecuaciones de las superficies (a una temperatura de 50 °C, 0.9 g de enzima durante un tiempo de 43 min), se proponen como las óptimas para la síntesis asistida por microondas.

B. Reacción de transesterificación asistida por Ultrasonido

Los rendimientos obtenidos por cada uno de los experimentos descritos en el diseño utilizado para la reacción de transesterificación teniendo como método de asistencia el ultrasonido se muestran en la Tabla 3.9. Al igual que utilizando irradiación con microondas, el experimento que presenta el mejor rendimiento en la obtención de

metilésteres es el número 6 realizado con 1 g de aceite, 0.1 g de enzima a una temperatura de 50 °C. En comparación, en este el tiempo de reacción fue de 60 min.

Tabla 3.9. Rendimiento de esteres metílicos por el método de ultrasonido

Orden Estadístico	Enzima (g)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Variables codificadas			Rendimiento (%)
				Enzima (g)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
1	0.05	30	55	-1	-1	0	63.59
2	0.1	30	55	1	-1	0	65.27
3	0.05	90	55	-1	1	0	63.48
4	0.1	90	55	1	1	0	55.81
5	0.05	60	50	-1	0	-1	60.31
6	0.1	60	50	1	0	-1	66.06
7	0.05	60	60	-1	0	1	63.79
8	0.1	60	60	1	0	1	32.22
9	0.075	30	50	0	-1	-1	46.23
10	0.075	90	50	0	1	-1	50.05
11	0.075	30	60	0	-1	1	38.57
12	0.075	90	60	0	1	1	44.81
13	0.075	60	55	0	0	0	32.30
14	0.075	60	55	0	0	0	36.40
15	0.075	60	55	0	0	0	36.98

En la Figura 3.15 se muestra el cromatograma correspondiente al experimento con el porcentaje de mayor rendimiento utilizando como método de asistencia el ultrasonido.

El análisis de varianza para los rendimientos de metilésteres se muestra en la Tabla 3.9. En este diseño utilizando calentamiento con irradiación de ultrasonido, 4 efectos (Tiempo B, enzima/tiempo AB, tiempo/temperatura BC y temperatura/temperatura

CB) tienen un valor- p menor que 0.05 mostrando diferencia significativa e indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El coeficiente de determinación (R^2) tiene un valor de 93.66 % ($R^2 \geq 80$), estando considerado como fiable para modelar datos con alta precisión para proponer variables y obtener la optimización correspondiente.

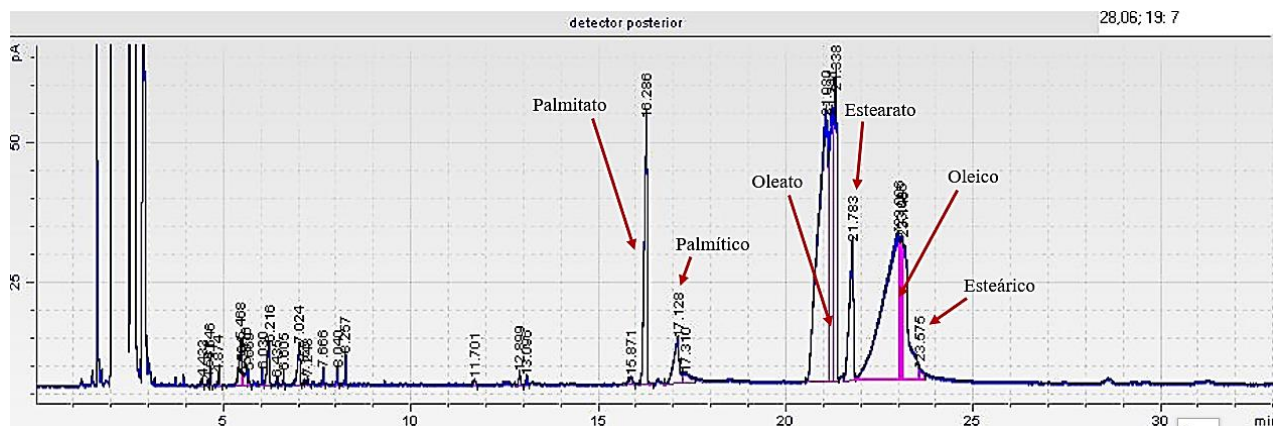


Figura 3.15. Cromatograma del experimento 6

Tabla 3.10. Análisis de varianza para rendimiento por metilésteres por el método de ultrasonido

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Enzima	126.485	1	126.485	4.26	0.0939
B:Tiempo	0.0300125	1	0.0300125	0.00	0.9759
C:Temperatura	233.928	1	233.928	7.88	0.0377
AA	1297.44	1	1297.44	43.70	0.0012
AB	21.8556	1	21.8556	0.74	0.4301
AC	348.196	1	348.196	11.73	0.0187
BB	240.188	1	240.188	8.09	0.0361
BC	1.4641	1	1.4641	0.05	0.8330
CC	9.72502	1	9.72502	0.33	0.5919
Error total	148.443	5	29.6887		
Total (corr.)	2341.11	14			

El diagrama de Pareto estandarizado (Figura 3.16) obtenido para el rendimiento por metilésteres utilizando ultrasonido en la reacción de transesterificación muestra de manera gráfica que, si existe significancia entre el factor principal C (Temperatura) y las interacciones A^2 , AC y B^2 , siendo este un factor que afecta mayormente durante la reacción de transesterificación. Los otros factores principales (A Enzima y B Tiempo) y sus interacciones, ninguno presenta gran influencia sobre la variable de respuesta.

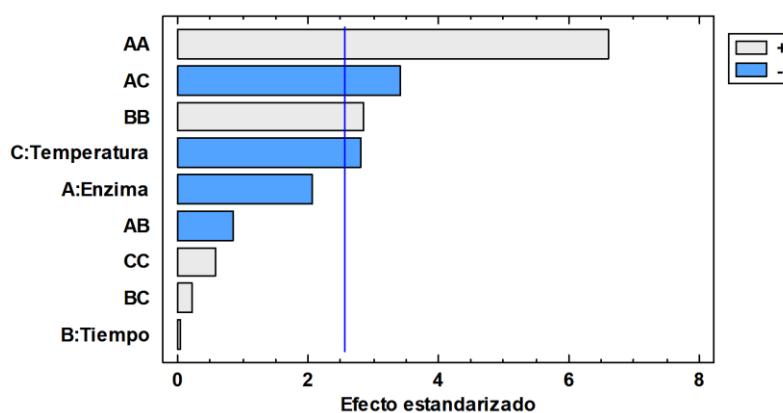


Figura 3.16. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de metilésteres utilizando ultrasonido

La gráfica Mitad-Normal presentada en la Figura 3.17, muestra el rendimiento por metilésteres de acuerdo a la desviación estándar que presenta cada uno de los factores y sus interacciones, teniendo que al ser ajustados el único factor principal que muestra desviación a los demás es la Temperatura aplicada en la reacción, así como, las interacciones A^2 y B^2 , estando alejadas de la recta de ajuste.

La Ecuación 3.2 muestra el polinomio de regresión de segundo orden obtenido mediante el análisis de los experimentos realizados utilizando como método de asistencia el ultrasonido:

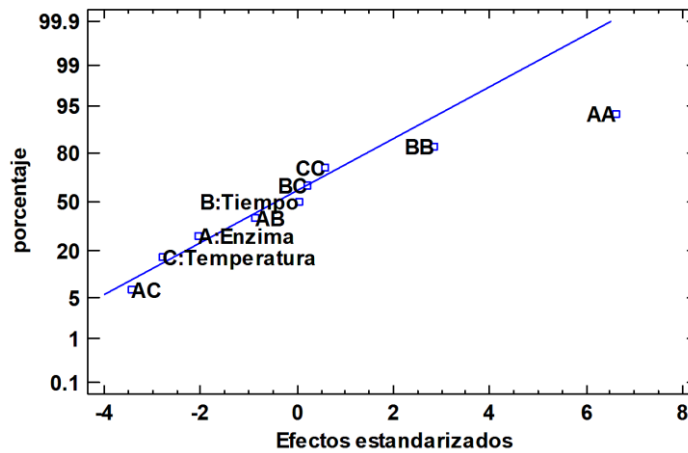


Figura 3.17. Gráfica Mitad-Normal para el rendimiento por metilésteres

Rendimiento

$$\begin{aligned}
 &= 195.254 - 365.75 * E - 1.06143 * Ti - 2.86633 * Te + 29992.7 * E^2 \\
 &- 3.11667 * E * Ti - 74.64 * E * Te + 0.00896157 * Ti^2 + 0.00403333 * Ti * Te \\
 &+ 0.0649167 * Te^2
 \end{aligned} \quad (3.2)$$

Las representaciones de los gráficos de superficie de respuesta estimada y contornos de la superficie de respuesta para las interacciones de los parámetros utilizados en el diseño experimental se muestran en la Figura 3.18 y la Figura 3.19, obtenidas mediante el software Minitab.

Se demuestra que existe un mínimo local en la interacción Enzima-Tiempo; por lo que, la región formada contiene los valores más bajos de rendimiento para la reacción de transesterificación y se encuentran en la parte central de la gráfica, que coincide con los valores medios para los parámetros Tiempo y Enzima. En la gráfica de contorno las interacciones Tiempo- Temperatura y Enzima-Temperatura presentan mínimos sin tener una región aparente.

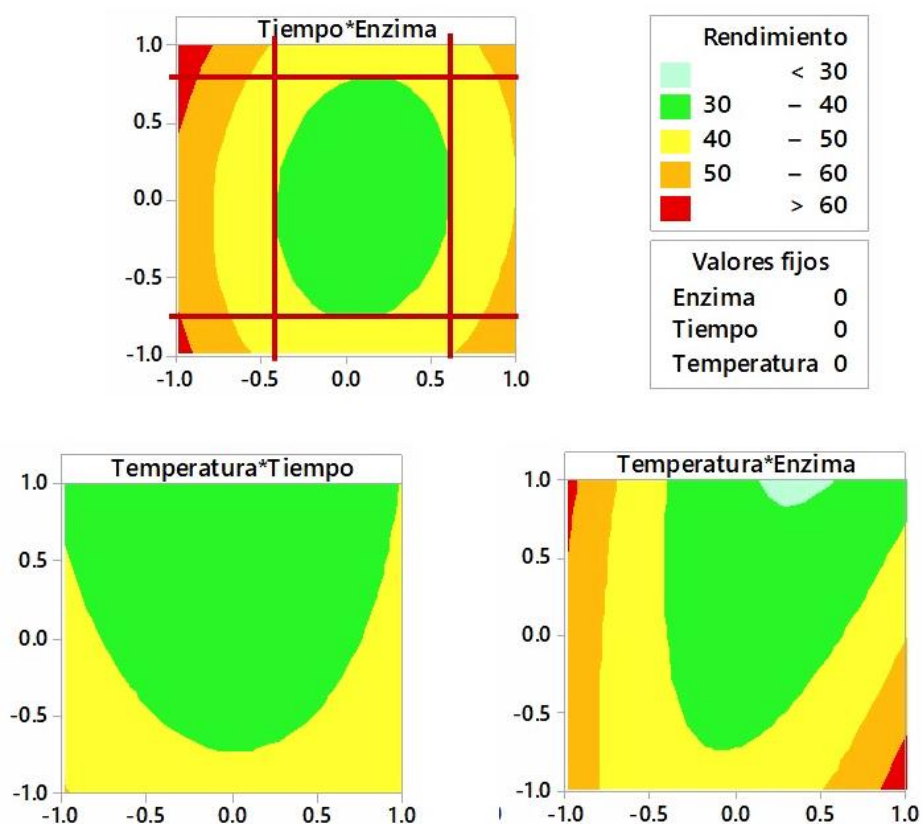


Figura 3.18. Gráfico de superficie de respuesta estimada por el método de ultrasonido

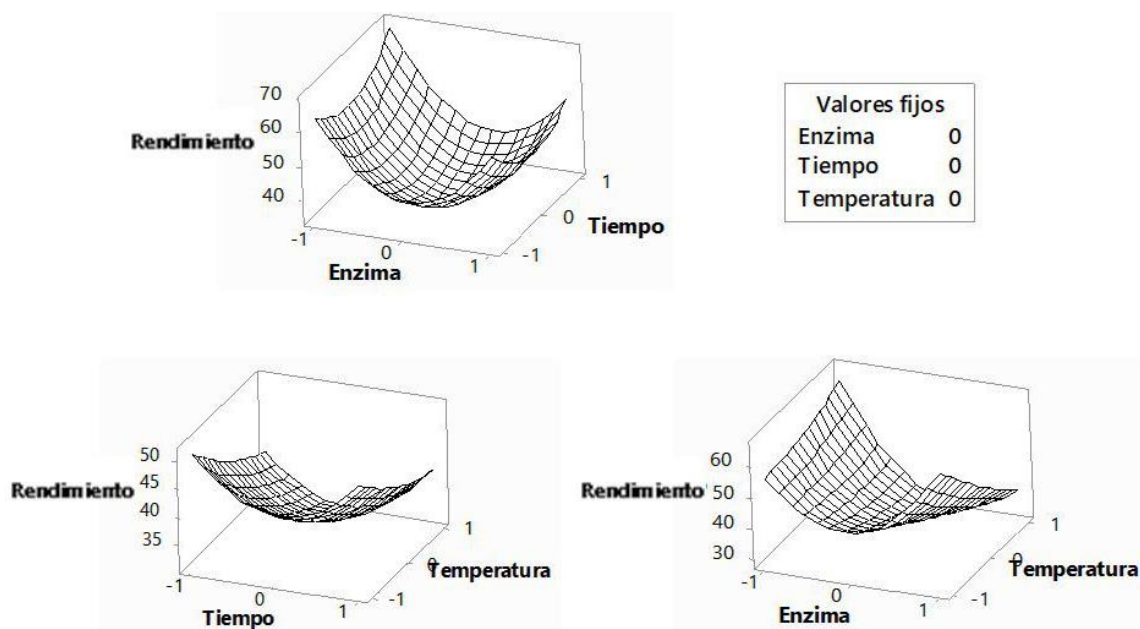


Figura 3.19. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta por el método de ultrasonido

La Tabla 3.11 muestra la combinación de los niveles (mínimo y máximo) de los factores utilizados en este diseño Box-Behnken, teniendo que el valor óptimo de rendimiento de biodiesel a partir de los metilésteres obtenidos utilizando como método de asistencia el ultrasonido mediante la optimización del software Minitab muestra que se debe realizar con 1g de aceite, 0.05 g de lipasa CAL B, 4 g de metanol, a una temperatura de 60 °C y con un tiempo de 90 min obteniendo un rendimiento de 74.4339 %.

Tabla 3.11: Optimización de la respuesta utilizando el método de ultrasonido

Factor	Bajo	Alto	Optimo
Enzima (g)	0.05	0.1	0.05
Tiempo (min)	30.0	90.0	89.7971
Temperatura (K)	50.0	60.0	60.0

Los datos obtenidos en el proceso de ultrasonido no permiten encontrar un punto óptimo de síntesis, sin embargo, el software encuentra una temperatura óptima justo en el límite de la superficie, el cual se respeta para mantener la calidad del producto final, así como un ahorro en el solvente.

Con los cálculos hechos, es mejor utilizar como método de asistencia las microondas en comparación con el uso del método de asistencia por ultrasonido, ya que los puntos óptimos en cuanto a la enzima se encuentran entre los 0.8 g hasta los 1.2 g dependiendo de las condiciones del proceso, con un rendimiento mucho menor considerando el proceso con microondas usando solo 0.9 g de enzima y manteniendo la calidad molecular del aceite.

3.4 Calculo de la energía de activación

Se utilizó la cinética química para estudiar de manera experimental la rapidez de una reacción de transesterificación asistida por dos métodos diferentes (microondas y ultrasonido).

Los factores determinados en el análisis experimental y que afectan la velocidad de una reacción química fueron la variación en concentración de los reactivos durante la reacción, utilización del catalizador (CAL B), temperatura empleada y tiempo del proceso.

Se consideró como reacción general para la obtención de metilésteres, la reacción entre triglicéridos del aceite de la semilla de *Hevea brasiliensis* y metanol utilizando como catalizador la enzima CAL B.



Donde TG son los triglicéridos, CH₃OH es metanol, EAAG son ésteres alquílicos de ácidos grasos y G es glicerol.

Se tomó en cuenta que la reacción de transesterificación es irreversible, teniendo que el alcohol utilizado se encontraba en exceso desplazando la reacción hacia la formación de ésteres metílicos y la mezcla de reacción fue completamente agitada, respectivamente, por la asistencia de microondas y ultrasonido, siendo la composición uniforme y a volumen constante. De acuerdo con esto la reacción de transesterificación fue esencialmente función de la concentración de triglicéridos consumidos.

3.4.1 Reacción de transesterificación asistida por Microondas

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis del rendimiento de metilésteres para una reacción de transesterificación asistida por microondas, la Tabla 3.6 muestra que el rendimiento más alto se presenta en el experimento 6 bajo las condiciones de 1 g de aceite, 4 g de metanol, 0.1 g de enzima CAL B, a una temperatura de 50 °C y un tiempo de irradiación con microondas de 30 min.

Se realizó la cinética química del experimento mencionado para determinar el avance de la reacción teniendo como puntos de análisis los tiempos de 5, 10, 15, 20 y 25 min. Se utilizó el contenido total de AG para determinar el orden que sigue la reacción de transesterificación y su constante de reacción.

En la Tabla 3.12 se presenta la concentración (en mol) obtenida de la cinética a las condiciones mencionadas:

Tabla 3.12. Cinética de reacción a una temperatura de 50 °C por el método de microondas

Experimento	Tiempo	Ácido Graso			
		Palmítico	Oleico	Estearico	Total
	(s)	(M)	(M)	(M)	(M)
6.1	300	2.91E-05	4.52E-05	7.14E-05	0.0001456
6.2	600	2.98E-05	3.88E-05	6.26E-05	0.0001311
6.3	900	2.91E-05	3.75E-05	5.94E-05	0.0001260
6.4	1200	3.00E-05	3.74E-05	5.13E-05	0.0001186
6.5	1500	2.86E-05	4.09E-05	4.57E-05	0.0001151

Se determinó el orden de la reacción y la constante de velocidad de acuerdo al método integral (Tabla 2.3). Los datos de concentración se representaron de manera gráfica (Concentración con respecto al tiempo) y aplicando mínimos cuadrados para determinar el ajuste. Esta corresponderá al orden donde la reacción de transesterificación se ajuste o aproxime a una línea recta.

En la Figura 3.20 se muestra la gráfica que corresponde al orden que mejor ajustó la cinética y de la cual se logra determinar la constante de velocidad (k).

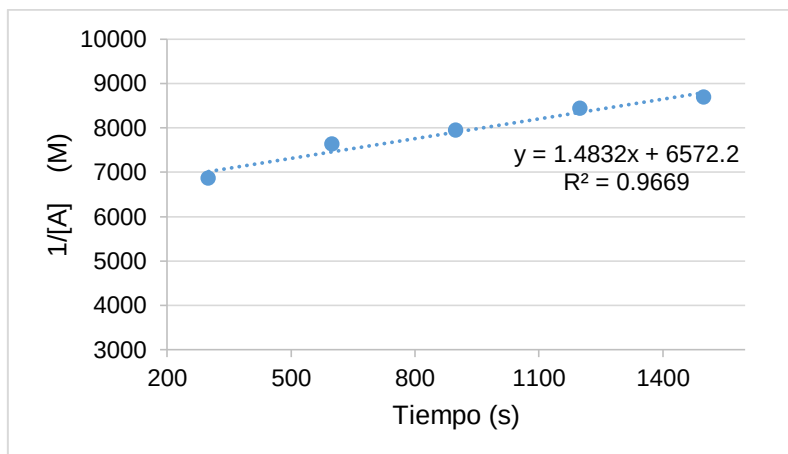


Figura 3.20. Ajuste de reacción a ecuación de orden 2

De acuerdo con la Tabla 2.3 se determinó que la constante de velocidad corresponde al valor de la pendiente siendo $k = 1.4832 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y teniendo que el ajuste a una línea recta es mayor ($R^2 = 0.9669$) la reacción de transesterificación será una reacción de segundo orden.

La energía de activación fue calculada mediante la ecuación de Arrhenius aplicando el logaritmo natural para obtener la ecuación linealizada. Se determinó la constante de velocidad para la reacción del experimento 6 a las mismas condiciones y diferente temperatura (55 y 60 °C). En la Tabla 3.13 se muestra la comparación de los datos obtenidos:

Tabla 3.13. Constante de velocidad a diferentes temperaturas y parámetros para determinar

Energía de activación

Temperatura (°C)	Orden de reacción	Constante de velocidad, k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\frac{1}{T}$ (K^{-1})	Ln (k)
50	2	1.4832	0.00309	0.3942
55	2	1.8549	0.00304	0.6178
60	2	2.3472	0.003001	0.8532

La energía de activación se calculó de acuerdo a la Tabla 2.4. En la Figura 3.21 se observa que al graficar $1/T$ y $\ln(k)$ los datos tienden a ser una recta; sin embargo, debido a la dispersión y a la variabilidad de estos, por el método de mínimos cuadrados se busca la ecuación de la recta que mejor se ajuste a los datos.

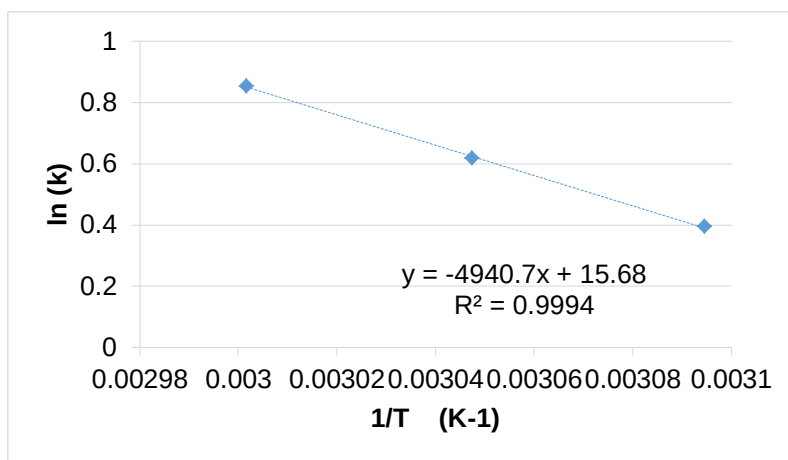


Figura 3.21. Ajuste de constantes de velocidad a la recta

La energía de activación se calcula con el valor de la pendiente y relacionando la constante de los gases de $R = 8.314 \frac{J}{mol \cdot K}$.

Dónde:

$$m = -\frac{E_a}{R}$$

$$E_a = -m \cdot R = -(-4940.7 K) \cdot \left(8.314 \frac{J}{mol \cdot K}\right) = 41076.98 \frac{J}{mol}$$

La energía de activación correspondiente a la reacción de transesterificación asistida por microondas de acuerdo al diseño experimental 6 con mejor rendimiento para formación de metilésteres es de $E_a = 41076.9798 \frac{J}{mol}$ y el ajuste a una línea recta es $R^2 = 0.9994$.

3.4.2 Reacción de transesterificación asistida por Ultrasonido

La Tabla 3.9 presenta los resultados obtenidos en el análisis del rendimiento de metilésteres en una reacción de transesterificación asistida por ultrasonido obteniendo el rendimiento más alto del diseño experimental en el experimento 6 bajo las condiciones de 1 g de aceite, 4 g de metanol, 0.1 g de enzima CAL B, a una temperatura de 50 °C y un tiempo de irradiación con ultrasonido de 60 min.

De igual manera, para determinar el orden que sigue la reacción de transesterificación y su constante de reacción se realizó la cinética química teniendo como puntos de análisis los tiempos de 10, 20, 30, 40 y 50 min.

La concentración (en mol) obtenida de la cinética a las condiciones del experimento con mayor rendimiento se presenta en la Tabla 3.14. El orden de la reacción y la constante de velocidad se determinaron de acuerdo al método integral mencionado en la Tabla 2.3.

Tabla 3.14. Cinética de reacción a una temperatura de 50 °C por el método de ultrasonido

Experimento	Tiempo	Ácido Graso			
		Palmítico	Oleico	Esteárico	Total
	(s)	(M)	(M)	(M)	(M)
6.1	300	4.77E-05	6.37E-05	0.00012539	0.00023675
6.2	600	4.05E-05	6.89E-05	8.81E-05	0.00019742
6.3	900	3.64E-05	6.78E-05	7.66E-05	0.00018072
6.4	1200	4.30E-05	5.65E-05	8.63E-05	0.00018581
6.4	1500	3.62E-05	4.87E-05	8.31E-05	0.00016798

En la Figura 3.22 se muestra la gráfica correspondiente al orden que mejor ajusta la cinética y permite determinar la constante de velocidad (k).

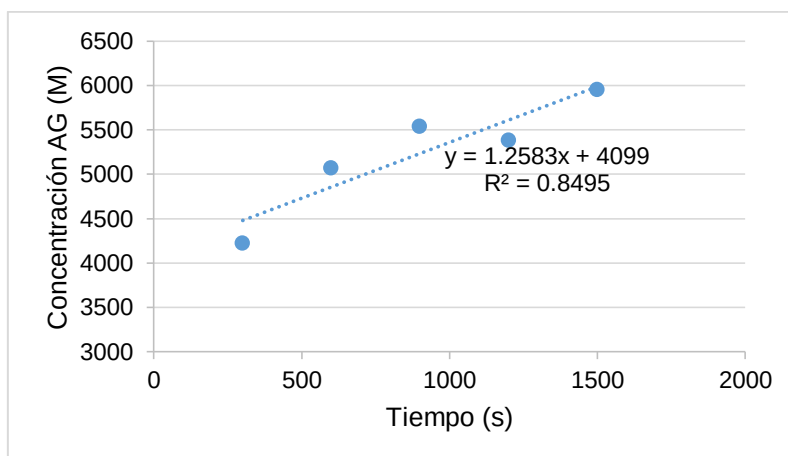


Figura 3.22. Ajuste de reacción a ecuación de orden 2

El mejor ajuste a una línea recta es de $R^2 = 0.8495$, por lo que, la reacción de transesterificación asistida por ultrasonido será una reacción de segundo orden. La constante de velocidad corresponde al valor de la pendiente siendo $k = 1.2583 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La energía de activación fue calculada mediante la ecuación de Arrhenius (Ecuación Linealizada), por lo que se determinó la constante de velocidad para la reacción del experimento 6 a las mismas condiciones y diferente temperatura (55 y 60 °C). En la Tabla 3.15 se muestra la comparación de los datos obtenidos:

Tabla 3.15. Constante de velocidad a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Orden de reacción	Constante de velocidad, k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\frac{1}{T}$ (K^{-1})	Ln (k)
50	2	1.2583	0.00309	0.2298
55	2	1.9613	0.00304	0.6736
60	2	3.0248	0.003001	1.1068

Al graficar los datos $1/T$ y $\text{Ln}(k)$, se buscó por el método de mínimos cuadrados la ecuación de la recta que mejor se ajuste a los datos. En la Figura 3.23 se muestra el ajuste de las constantes de velocidad obtenidas a diferentes temperaturas.

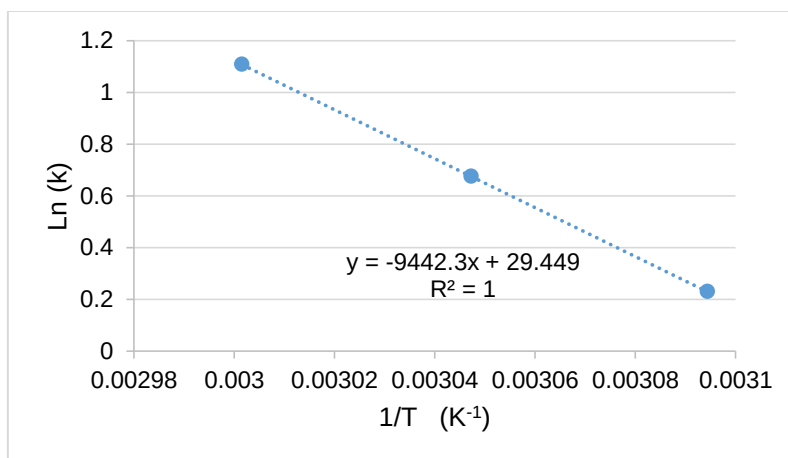


Figura 3.23. Ajuste de constantes de velocidad a la recta

La energía de activación se calcula con el valor de la pendiente y relacionando la constante de los gases de $R = 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$.

Dónde:

$$m = -\frac{E_a}{R}$$

$$E_a = -m \cdot R = -(-9442.3 \text{ K}) \cdot \left(8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right) = 78503.282 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$$

La energía de activación correspondiente a la reacción de transesterificación asistida por ultrasonido de acuerdo al diseño experimental número 6 con mejor rendimiento para formación de metilésteres es de $E_a = 78503.282 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$ y el ajuste a una línea recta es $R^2 = 1$.

3.5 Discusión de resultados

Para lograr comparar de mejor manera el efecto causado por ambos métodos de asistencia utilizados durante la reacción de transesterificación se verificó el valor de la energía de activación asociada al mecanismo de acción de cada uno de los

métodos comparados en esta investigación. Para determinar la energía de activación de la reacción de transesterificación a partir del aceite obtenido de la semilla del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) se determinó que el orden de reacción al que mejor se ajusta para ambos métodos de asistencia (ultrasonido y microondas) es de orden 2, donde la constante de velocidad a 50 °C determinada para el método asistido por ultrasonido es de $1.2583 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y en comparación para el método asistido por microondas de $k = 1.4832 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En la Tabla 3.16 se muestra la comparación de resultados obtenidos en este estudio con respecto a otros obtenidos utilizando características similares. La energía de activación presente en la reacción de transesterificación de aceite de semilla de *Hevea brasiliensis* obtenida mediante diferentes métodos, puede variar de acuerdo a parámetros muy diversos. Se puede observar que la mejor energía de activación se presenta en la obtenida en este estudio utilizando como método de asistencia las microondas siendo de $41076.9798 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$, mientras que la obtenida en la reacción de transesterificación asistida por ultrasonido es de $78503.282 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$.

En comparación, Krishnakumar *et al.* (2017) reportan una energía de activación mayor ($75800 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$), considerando que la reacción se llevó con un tiempo cinco veces más que lo reportado en este estudio. Teniendo que la energía de activación corresponde a la energía que necesita el sistema antes de poder iniciar el proceso de transesterificación, mientras mayor sea esta, más lenta será la reacción química. Por lo que la reacción de transesterificación asistida por microondas comenzara de manera más rápida que la reacción asistida por ultrasonido (a las mismas condiciones de operación misma cantidad de aceite, metanol, enzima y temperatura) o por agitación mecánica, ya que la barrera a superar es menor en la primera. Esto debido a que, al utilizar un baño ultrasónico con un campo de irradiación mayor en comparación con el presentado en el equipo de microondas, la cavitación producida presenta una distribución de irradiación ultrasónica baja y de desigual intensidad

presentando variaciones espaciales significativas en la intensidad de cavitación, en comparación con la irradiación con microondas donde el campo de irradiación es más pequeño, proporcionando rápidamente la energía suficiente para superar la barrera e iniciar la reacción causando un movimiento molecular más rápido y un número más grande de colisiones, logrando completar la reacción con mayor rendimiento que utilizando el método de asistencia por ultrasonido.

Tabla 3.16. Comparación de variables obtenidas durante el proceso de transesterificación del aceite de semilla de *Hevea brasiliensis*

	Trabajo actual		Krishnakumar et al., (2017)	Huong et al., (2018)	Chuah et. al., (2016)
Método de asistencia	Microondas	Ultrasonido	Agitación mecánica	Ultrasonido	Agitación mecánica
Materia prima	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Hevea brasiliensis</i> (Kerala)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Vietnam)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Malasia)
Metanol: Aceite (mol:mol)	6:1	6:1	6:1	23:1	15.98:1
Catalizador (% en peso)	CAL B 10	CAL B 10	CaO 0.8	H ₂ SO ₄ 7.5	H ₂ SO ₄ 1.38
Temperatura (°C)	50	50	60	50	50
Tiempo de reacción (min)	30	60	180	23	120
Conversión (%)	61.54	66.06	98.2	98	99.3
Energía de activación (J/mol)	41076.9798	78503.282	75800	52577	20700

CONCLUSIONES

- El rendimiento promedio de materia seca obtenida de las semillas del árbol de *Hevea brasiliensis* es del 61.75 % y un promedio del porcentaje de humedad del 38.25 %: En comparación con el peso inicial de las semillas del fruto el rendimiento de materia seca es alto ya que se reduce únicamente un aproximado del 19 % el peso de las semillas.
- La neutralización de pH del aceite refinado no es un factor determinante en la reacción de transesterificación y no se modifica el valor del mismo al realizar el proceso de desgomado en ambos casos (ácido y acuoso, respectivamente). Sin embargo, el mejor proceso de desgomado de aceite obtenido y caracterizado mediante normatividad mexicana es el refinado acuoso. Este presenta menor rendimiento al finalizar el proceso, pero mejores condiciones de humedad y materia volátil, AGL (% oleico) y pH en comparación con el desgomado ácido.
- De acuerdo a los diseños realizados en la reacción de transesterificación el mejor rendimiento en la obtención metilésteres asistido con ultrasonido y microondas, respectivamente, se encuentra para ambos en el experimento número 6 que se realizó a una temperatura de 50 °C, con 0.1 g de enzima CAL B y 4 g de metanol, teniendo un tiempo de irradiación por ultrasonido de 60 min e irradiación por microondas de 30 min.

De acuerdo a los gráficos realizados en Minitab:

- Los resultados obtenidos en la síntesis de biodiesel utilizando el aceite con desgomado acuoso y asistida por microondas muestran que al mantener la temperatura en 50 °C se presenta la apariencia de un máximo local, al analizar el diagrama de Pareto, la gráfica de mitad-normal y los gráficos

correspondientes a la superficie de respuesta y contorno de la superficie de respuesta, se observa que no se obtuvo un efecto significativo en las variables para este diseño (Enzima, Tiempo y Temperatura). Basándose en los datos experimentales, el experimento 6 presenta el rendimiento más alto con un valor de 61.54 %.

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el software Minitab se tiene que de acuerdo al rendimiento óptimo de biodiesel asistido por microondas se proponen como condiciones de operación utilizar 0.09 g de enzima CAL B con un tiempo de irradiación con microondas de 43 min a una temperatura de 50 °C logrando tener un rendimiento aproximado a 63 %.
- De acuerdo a los parámetros obtenidos al realizar la optimización por el método de microondas, la temperatura puede ser un factor a fijar (50 °C) y buscar la mejor interrelación Enzima-Tiempo. Considerando que de acuerdo al valor del coeficiente de determinación (72.91 %) se considera poco fiable para modelar datos con alta precisión y proponer variables.
- Con respecto a los resultados obtenidos en la síntesis de biodiesel asistida por ultrasonido los diagramas indican de manera gráfica que únicamente existe significancia del factor principal Temperatura siendo este un factor que afecta mayormente durante la reacción de transesterificación. Basándose en los datos experimentales, el experimento 6 presenta el rendimiento más alto con un valor de 66.06 %.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en el software Minitab el rendimiento óptimo de biodiesel asistido por ultrasonido se obtiene con condiciones de operación de 0.05 g de enzima CAL B con un tiempo de irradiación con microondas de 90 min a una temperatura de 60 °C logrando tener un rendimiento de aproximadamente 74 %. El coeficiente de determinación

presenta un valor de 93.66 % siendo fiable para modelar datos con alta precisión y obtener la optimización correspondiente.

- La reacción de transesterificación realizada corresponde a una reacción de orden 2, donde la reacción de transesterificación asistida por ultrasonido presenta una energía de activación de $78503.282 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$, mientras que para la reacción asistida por microondas es de $41076.9798 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$ determinando que el método de asistencia que con mejores resultados es mediante el uso de microondas debido a su capacidad de introducir la energía de microondas de forma eficiente en el sistema de reacción produciendo un calentamiento interno mayor y convertir de manera efectiva la energía electromagnética en calor (energía cinética) lo que provoca un mayor número de colisiones energéticamente favorables y lograr acelerar la reacción de síntesis.

RECOMENDACIONES

- Comparar otros solventes para la extracción del aceite obtenido de las semillas de *Hevea brasiliensis*, que disminuyan los tiempos de extracción o que permita obtener mejores porcentajes de rendimiento.
- Comparar rendimientos de aceite contenido en las semillas con otros métodos de extracción que se encuentren dentro de la química verde para volver el proceso más amigable con el ambiente.
- Realizar el análisis bromatológico a los residuos sólidos obtenidos después de cada extracción con el fin de obtener información sobre su composición y de esta manera poder establecer una aplicación alternativa como subproducto o desecho.
- Comparar la reacción de transesterificación con el método de calentamiento convencional con el fin de verificar que tan factible es la utilización tanto de otros métodos de asistencia y como de la catálisis enzimática. Además de comparar rendimientos utilizando otros métodos de asistencia que utilicen la química verde, teniendo dentro de este el uso de una sonda ultrasónica.
- Fijar la temperatura a (50 °C) y aumentar los tiempos de irradiación con microondas durante la reacción de transesterificación para verificar si los rendimientos obtenidos de metilésteres aumentan, ya que en la catálisis enzimática el tiempo de reacción puede ser mayor que el utilizado en la catálisis química.
- Comparar la energía de activación con la obtenida mediante un proceso sin catalizar y asistido por calentamiento convencional, para determinar que tanto se disminuye la energía de activación por el uso de un catalizador enzimático y la aplicación de métodos de asistencia de calentamiento y agitación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, R. C. E., y Santoyo, H. (2013). El cultivo del árbol del hule (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) y la innovación como instrumento para elevar la competitividad en México. (14-24).

Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Ong, H. C., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H., Badruddin, I. A., y Fayaz, H. (2013). Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **18**, (211–245). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.013>

Avellaneda Vargas, F. A. (2010). Producción y caracterización de biodiesel de palma y de aceite reciclado mediante un proceso batch y un proceso continuo con un reactor helicoidal. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona.

Bailey, A. E. (2001). *Aceites y grasas industriales*. Reverté, Barcelona. 978-84-291-7901-9 (4-22)

Chuah, L.F., Bokhari, A., Yusup, S. *et al.* (2016). Optimisation and Kinetic Studies of Acid Esterification of High Free Fatty Acid Rubber Seed Oil. *Arab J Sci Eng* **41**, 2515–2526 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13369-015-2014-1>

Claramunt Vallespí, R. M., Farran Morales, M. D., López García, C., Pérez Torralba, M., & Santa María Gutiérrez, D. (2013). *Química bioorgánica y productos naturales*. UNED, Madrid, España. 9788436266245.

De Lera Santín, A. (2011). Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.

Dunn, P. J., Wells, A. S., y Williams, M. T. (2010). Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry. In *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*. 978-3-527-32418-7(1-20)

FAO. (2013). La bioenergía y los biocombustibles. <http://www.fao.org/3/a-ar589s.pdf> (consultada Noviembre, 2018)

García, M. (2005). *Hidrolisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W*.

Aplicación a formulaciones detergentes. Tesis Doctoral. Universidad de Granada facultad.

Gibaja Oviedo, S. (1998). *Pigmentos naturales quinónicos*. Lima: UNMSM, Fondo Editorial. 10: 9972460428.

Gonzalez Cuenca, M. (2013). *Producción de biodiesel mediante el uso de lipasas y algas*. Facultad de ingeniería y ciencias químicas. Universidad Veracruzana.

González Hernandez, A., Romero Sanchez, M. E. Pérez Miranda, R., Zamora Martinez, M. C., Islas Trejo, B. L. y López Espinosa, A. G. (2017). Potencial productivo para el establecimiento de *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. en el trópico húmedo mexicano. Libro Técnico Núm. 12. Cenid-Comef, INIFAP. Ciudad de México, México. p 86.

Guo, M., Song, W., y Buhain, J. (2015). Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (42), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.013>

Hernández, C., Mieres, A., Niño, Z., y Pérez, S. (2007). Efecto de la refinación física sobre el aceite de la almendra del corozo (*Acrocomia aculeata*). *Informacion Tecnologica*, 18(5), 59–68. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642007000500008>

Huong, T., Suzana, Y., y Yoshimitsu, U. (2018). Optimization and kinetic study of ultrasonic assisted esterification process from rubber seed oil. *Bioresource Technology*, 247.51-57.

Iyayi, A. F., Akpaka, P. O., y Ukpeoyibo, U. (2008). Rubber seed processing for value-added latex production in Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, 3(7), 505–509.

José, C. (2013). *Resolución biocatalítica de enantiómeros del ibuprofeno*. Facultad de Ciencias Exactas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

Kappe, C. O. (2004). Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(46), 6250–6284. <https://doi.org/10.1002/anie.200400655>

Kittigowittana, Krisada, Wongsakul, Sirirung, Krisdaphong, Panvipa, Jimtaisong, Ampa y Saewan, Nisakorn. (2013). *Fatty acid composition and biological activities of seed oil from rubber (Hevea brasiliensis) cultivar RRIM 600*. International Journal of Applied Research in Natural Products. 6. 1-7.

Krishnakumar, U., y Sivasubramanian, V. (2017). Kinetic study of preparation of biodiesel from crude rubber seed oil over a modified heterogeneous catalyst. *Indian Journal of Chemical Technology*, 430-434.

Leadbeater, N. E. (2010). *Microwave Heating as a Tool for Sustainable Chemistry* (M. C. Cann, Ed.). New York: CRC Press. 13: 978-1-4398-1270-9.

Legaz Berbel, R. (2010). Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible. Universitat Politècnica de Catalunya. España.

Lodeiro, A. R. (2015). *Catálisis enzimática Fundamentos químicos de la vida*. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de la Plata.

Lombana Coy, J., Vega Jurado, J., Britton Acevedo, E., Herrera Velásquez, S. (2015). Análisis del sector biodiesel en Colombia y su cadena de suministro. Universidad del norte. Barranquilla, Colombia.

Loupy, A. (2006). Microwaves in Organic Synthesis. In A. Loupy (Ed.), *Microwaves* (Second). Wiley-VCH Verlag GmbH.

Mardhiah, H. H., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Lim, S., y Lee, H. V. (2017). A review on latest developments and future prospects of heterogeneous catalyst in biodiesel production from non-edible oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **67**, 1225–1236. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.036>

Martínez Valencia, B. B., Zamarripa Colmenero, A., Solís Bonilla, J. L., & López Ángel, L. J. (2011). Calidad fisicoquímica de insumos bioenergéticos para la producción de biodiesel en México. SAGARPA, INIFAP. Tuxtla Chico, Chiapas: Centro de Investigación Regional Pacífico Sur.

Mason, T. J. (2011). *Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems* (M. Ashokkumar, Ed.). Springer.

Mason, T. J., y Lorimer, J. P. (2002). General Principles. In *Applied Sonochemistry*:

Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH. (25-74)

Oladipo, B., y Betiku, E. (2020). Optimization and kinetic studies on conversion of rubber seed (*Hevea brasiliensis*) oil to methyl esters over a green biowaste catalyst. *Journal of Environmental Management*, **268**, 110705. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110705>

Onoji, S. E., Iyuke, S. E., y Igbafe, A. I. (2016). *Hevea brasiliensis* (Rubber Seed) Oil: Extraction, Characterization, and Kinetics of Thermo-oxidative Degradation Using Classical Chemical Methods. *Energy and Fuels*, **30**(12), 10555–10567. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02267>

Onoji, S. E., Iyuke, S. E., Igbafe, A. I., y Nkazi, D. B. (2016). Rubber seed oil: A potential renewable source of biodiesel for sustainable development in sub-Saharan Africa. *Energy Conversion and Management*, **110**, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.12.002>

Orerome, R. O., Aganmwonyi, I., Itabor, N. A., Damisah, L. E., y Bakare, I. O. (2019). Biodiesel Production from Rubber Seed Oil using Lipase enzyme. *Journal of Chemical Society of Nigeria*, **44**(6), 1113–1118. Retrieved from http://umpir.ump.edu.my/4509/1/CD6469_CITRA_CHARAN_SURI_CHARAN_KANWAL.pdf

Panichikkal, A. F., Prakasan, P., Kizhakkepowathial Nair, U., y Kulangara Valappil, M. (2018). Optimization of parameters for the production of biodiesel from rubber seed oil using onsite lipase by response surface methodology. *3 Biotech*, **8**(11), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1477-7>

Quesada Ganuza, A. 2014. Propiedades catalíticas de la lipasa B de *Candida antártica* inmovilizada en soportes magnéticos. Actividad sintética en disolventes orgánicos. Universidad del País Vasco. Facultad de Ciencia y Tecnología. LEIOA.

Ramadhas, A. S., Jayaraj, S., y Muraleedharan, C. (2005). Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel*, **84**(4), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2004.09.016>

RCSB PDB (2016). RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB). <https://www.rcsb.org/> (consultada Junio, 2018)

Rodríguez Castañeda, J. R. (2006). Producción y evaluación de biodiesel a partir de aceite de girasol (*Heliantus annuus*) de desecho del comedor estudiantil de Zamorano. Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras: Zamorano.

Rodríguez Somolinos, F. (2006). La biosfera V: Las grasas como materia prima. En Á. Vian Ortuño, Introducción a la Química Industrial. REVERTÉ, Barcelona, España.

Rojas González, A. F., Girón Gallego, E., y Torres Castañeda, H. G. (2010). Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión - catálisis enzimática Operation variables in transesterification of vegetable oil: an enzymatic catalysis review. *Ingeniería e Investigación*, **30**(1), 17–21.

Rojo, G. E., Martínez, R., y Jasso, J. (2011). El cultivo de Hule en México. In *Libros* (Primera). Mochicahui,: Universidad Autónoma Indígena de México.

Sabarish, C. S., Sebastian, J., y Muraleedharan, C. (2016). Extraction of Oil from Rubber Seed through Hydraulic Press and Kinetic Study of Acid Esterification of Rubber Seed Oil. *Procedia Technology*, **25**, 1006–1013. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.08.200>

Salazar, R., Soihet, C., y Méndez, J. M. (2000). *Manejo de 100 semillas forestales de América Latina*. (D. F. Center, Ed.) Turrialba (Costa Rica): Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE.

Sharma, R., Chisti, Y., y Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, **19**(8), 627–662. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6)

SIAP (2016). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/ (consultada Junio, 2018)

Sitepu, E. K., Heimann, K., Raston, C. L., y Zhang, W. (2020). Critical evaluation of process parameters for direct biodiesel production from diverse feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **123**, 109762. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109762>

Tan, S. X., Lim, S., Ong, H. C., y Pang, Y. L. (2019). State of the art review on development of ultrasound-assisted catalytic transesterification process for biodiesel production. *Fuel*, **235**, 886–907. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.08.021>

Ureta, J., Vello, M., Ledesma, L., Uthurralt, M., y Casais, R. (2015). *Guía del correcto uso y descarte de aceites vegetales*. Buenos Aires.

Zhu, Y., Xu, J., Li, Q., y Mortimer, P. E. (2014). Investigation of rubber seed yield in Xishuangbanna and estimation of rubber seed oil based biodiesel potential in Southeast Asia. *Energy*, **69**, 837–842. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.03.079>

ANEXOS

Anexo A. RESULTADOS

B.1 MICROONDAS

Análisis de varianza para rendimiento por metilésteres por método de microondas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Enzima	14.6611	1	14.6611	0.22	0.6594
B:Tiempo	22.2444	1	22.2444	0.33	0.5892
C:Temperatura	439.413	1	439.413	6.57	0.0505
A ²	31.4192	1	31.4192	0.47	0.5236
AB	5.8564	1	5.8564	0.09	0.7792
AC	6.32522	1	6.32522	0.09	0.7709
B ²	82.2442	1	82.2442	1.23	0.3180
BC	139.004	1	139.004	2.08	0.2090
C ²	138.651	1	138.651	2.07	0.2095
Error total	334.514	5	66.9028		
Total (corr.)	1234.75	14			

Rendimiento de esteres metílicos por microondas

Orden Estadístico	Enzima (g)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ácidos Grasos restantes				Metilésteres formados				Rendimiento (%)
				Palmítico (mg)	Oleico (mg)	Esteárico (mg)	Total (mg)	Palmitato (mg)	Oleato (mg)	Estearato (mg)	Total (mg)	
1	0.05	15	55	5.7695	23.4312	13.8109	43.0116	3.7629	12.5982	4.4863	20.8475	32.65
2	0.1	15	55	4.6160	18.2093	10.3963	33.2216	3.5554	12.5203	4.4189	20.4946	38.15
3	0.05	45	55	4.7961	24.3640	10.7548	39.9149	3.7971	12.7017	4.4955	20.9944	34.47
4	0.1	45	55	3.9604	13.2298	8.6596	25.8497	3.8644	12.7172	4.4097	20.9913	44.81
5	0.05	30	50	3.7850	11.4947	4.7105	19.9902	8.7732	15.6151	7.5845	31.9728	61.53
6	0.1	30	50	3.6697	14.4461	8.3053	26.4211	11.7448	21.0361	9.4992	42.2801	61.54
7	0.05	30	60	4.4806	20.2829	14.2270	38.9905	4.8514	13.5509	5.2015	23.6038	37.71
8	0.1	30	60	3.9694	23.8022	15.5668	43.3384	3.8440	12.8370	4.3680	21.0490	32.69
9	0.075	15	50	3.7218	26.9689	1.9217	32.6124	4.4686	13.1853	5.1098	22.7637	41.11
10	0.075	45	50	3.0836	14.9085	3.3746	21.3667	6.3239	14.2022	5.9398	26.4658	55.33
11	0.075	15	60	3.4525	15.7246	1.7651	20.9423	3.5932	12.5306	4.4758	20.5996	49.59
12	0.075	45	60	3.4281	24.2631	4.9899	32.6812	3.8987	12.8201	5.2742	21.9930	40.23
13	0.075	30	55	3.5470	23.6614	9.1712	36.3796	6.3015	14.6335	6.4447	27.3797	42.94
14	0.075	30	55	3.3608	19.4967	8.0266	30.8840	6.8820	15.0521	6.5833	28.5174	48.01
15	0.075	30	55	3.4846	21.2740	10.3773	35.1359	6.7448	14.9728	6.4811	28.1987	44.52

B.2 ULTRASONIDO

Análisis de varianza para rendimiento por metilésteres por método de ultrasonido

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Enzima	126.485	1	126.485	4.26	0.0939
B:Tiempo	0.0300125	1	0.0300125	0.00	0.9759
C:Temperatura	233.928	1	233.928	7.88	0.0377
A ²	1297.44	1	1297.44	43.70	0.0012
AB	21.8556	1	21.8556	0.74	0.4301
AC	348.196	1	348.196	11.73	0.0187
B ²	240.188	1	240.188	8.09	0.0361
BC	1.4641	1	1.4641	0.05	0.8330
C ²	9.72502	1	9.72502	0.33	0.5919
Error total	148.443	5	29.6887		
Total (corr.)	2341.11	14			

Rendimiento de esteres metílicos por Ultrasonido

Orden Estadístico	Enzima (g)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ácidos Grasos restantes				Metilésteres formados				Rendimiento (%)
				Palmítico (mg)	Oleico (mg)	Estearico (mg)	Total (mg)	Palmitato (mg)	Oleato (mg)	Estearato (mg)	Total (mg)	
1	0.05	30	55	4.7119	18.26	4.3795	27.3514	11.877	24.1258	11.7663	47.769	63.59
2	0.1	30	55	3.6717	32.4259	2.7654	38.863	21.2523	33.2563	18.5145	73.0231	65.27
3	0.05	90	55	3.835	18.5474	6.8986	29.281	13.3037	24.809	12.7894	50.902	63.48
4	0.1	90	55	8.7907	13.0476	15.6849	37.5232	87.1545	105.8878	73.0654	47.396	55.81
5	0.05	60	50	3.7816	34.1489	5.1144	43.0449	16.4972	33.1312	15.7787	65.4071	60.31
6	0.1	60	50	13.8971	35.5903	4.5342	54.0215	33.6241	46.0589	25.4451	105.1281	66.06
7	0.05	60	60	8.5204	10.2701	13.7993	32.5899	15.3824	29.3418	12.6985	57.4227	63.79
8	0.1	60	60	12.9955	20.7184	43.2322	76.9462	9.1801	18.9507	8.4403	36.5712	32.22
9	0.075	30	50	9.9599	19.7757	25.9311	55.6667	14.0907	22.4152	11.3476	47.8536	46.23
10	0.075	90	50	9.3899	9.5493	35.2603	54.1994	14.0908	27.6854	12.5231	54.2994	50.05
11	0.075	30	60	12.2894	23.0464	26.2581	61.5939	9.6791	20.3444	8.6463	38.6698	38.57
12	0.075	90	60	9.5453	17.9988	14.4561	42.0002	9.6948	16.8647	7.5373	34.0968	44.81
13	0.075	60	55	10.7544	22.9505	25.4755	59.1805	6.6181	15.1105	6.5041	28.2327	32.30
14	0.075	60	55	9.4343	21.3501	21.6249	52.4093	7.6068	15.5725	6.8198	29.9992	36.40
15	0.075	60	55	9.6531	14.6742	27.9098	52.2371	7.4207	16.0427	7.1925	30.6559	36.98