

# Obtención de BIODIÉSEL a partir de aceite de MICROALGAS

Este trabajo muestra la producción de biodiésel a partir de aceite de microalga, obtenido por catálisis enzimática. Para preservar la actividad de las enzimas (Novozym 435 y Lipozyme TLIM), se reduce el metanol a una relación molar 1:1 respecto a aceite y se trabaja con proporciones elevadas de acetato de metilo. Es este, pues, el principal agente metilante y el que desplaza los equilibrios químicos hacia la producción de biodiésel. Los procesos de síntesis se han realizado en ausencia y en presencia de CO<sub>2</sub> supercrítico, analizando las muestras con RMN de protón y por HPLC de fase reversa. Se ha determinado que es especialmente relevante la necesidad de utilizar las dos enzimas conjuntamente para lograr la mejor actividad. También se obtiene mejor rendimiento (80% en 24 horas) cuanto mayor es el exceso de agentes metilantes y en el intervalo 40-50° C. En condiciones supercríticas se ha comprobado cómo la dilución apenas afecta a la actividad de las lipasas y, por tanto, a la productividad de los metilésteres.



Por **MIGUEL LADERO GALÁN**. Profesor Titular de Universidad. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. (e-mail: mladero@quim.ucm.es). **LOURDES CALVO GARRIDO**. Profesora Titular de Universidad.



Latinstock

Según el informe sobre tendencias futuras *Energy Outlook 2030*, de la compañía petrolera británica BP, para el año 2015 el producto interior bruto de la OCDE será igual al de la suma de los países no pertenecientes a la OCDE, con especial influencia de China y la India. Para entonces, estos países serán los principales consumidores de energía y, en consecuencia, los principales emisores de CO<sub>2</sub>. Por otra parte, en ellos

vivirán seis veces más personas que en los países de la OCDE <sup>[1]</sup>.

Las reservas de petróleo actuales están mermándose, con la previsión de que las reservas seguras (ya en explotación o explotables con un 90% de certeza) no puedan atender la demanda mundial por un periodo superior al del siglo que ya ha entrado. Sin embargo, la percepción de esta realidad está más ligada al llamado pico de producción o pico de Hubbert,

que pasa a ser un índice de carestía de petróleo al sumarse a la tendencia actual de mayor demanda de crudo. Este pico, según la fuente que se consulte, se habría alcanzado o se alcanzará en una fecha próxima (2037, según las previsiones más optimistas) <sup>[2]</sup>. Palabras como eficiencia energética, fuentes de energía renovables, sostenibilidad, intensificación de procesos, diversificación energética... no proceden de una moda pasajera: son

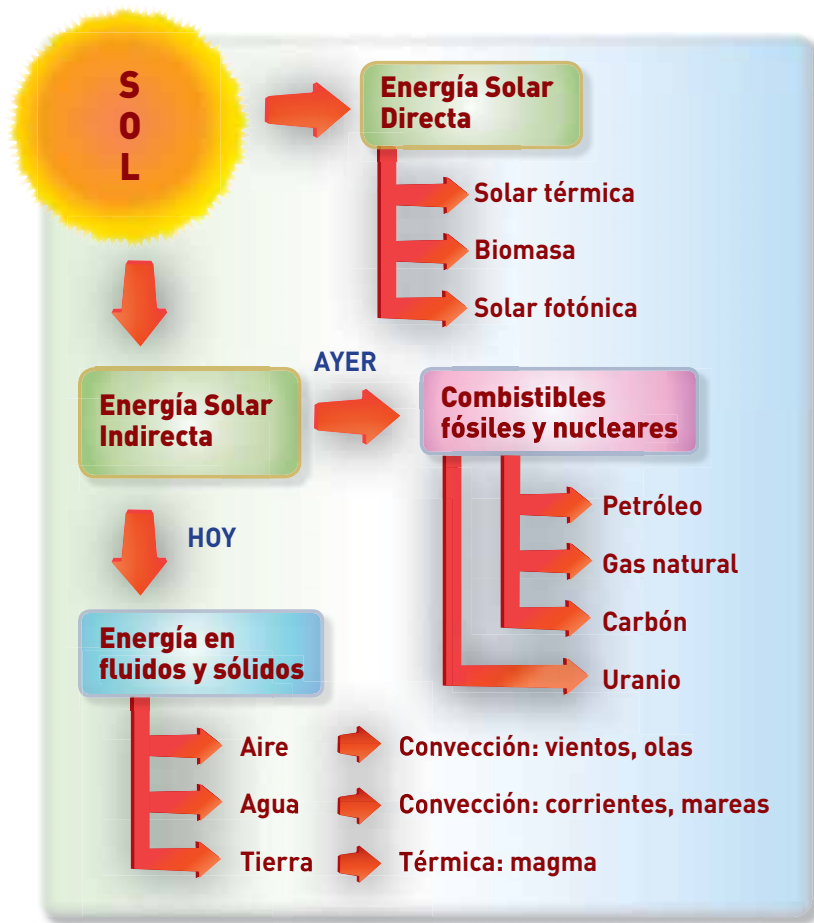
**La Unión Europea, a través de la directiva 2009/28/CE, quiere profundizar en la diversificación en la generación energética, de tal forma que las FER supongan el 20% de la energía primaria producida para 2020 y el 10% de la energía gastada en el sector de transporte**

síntoma de un cambio de ciclo, una percepción de que el uso intensivo y lineal de la energía, sin reposición, no es aceptable ni es realista a medio plazo. Es hora de dar paso a nuevas tecnologías que procuren de forma cíclica y renovable la energía necesaria para la Humanidad, reduciendo al mismo tiempo las pérdidas de energía. El potencial es considerable: la Tierra recibe del Sol 10.000 veces más energía que la utilizada anualmente en todo el planeta. La energía potencial procedente de biomasa asciende cada año al triple del consumo energético mundial, mientras que la energía anual procedente de vientos y olas es veinte veces mayor. Las fuentes geotérmicas podrían proveer de sesenta veces más energía que la necesaria cada año a nivel mundial (Figura 1). Por otra parte, el margen de optimización del aprovechamiento energético es considerable y se puede abordar a través de nuevos ciclos termodinámicos (pilas de combustible) y de nuevos sistemas de transporte y de almacenamiento de energía, en especial eléctrica.

La aportación de las fuentes de energía renovable (FER) a la producción y consumo de energía primaria es, año a año, cada vez más considerable. En la generación de energía eléctrica en 2009, en España, se emplearon estas fuentes en un 24%, con una especial incidencia de la energía eólica (un 12,4%) y la hidráulica (un 9% del total). La Unión Europea, a través de la directiva 2009/28/CE, quiere profundizar en la diversificación en la generación energética, de tal forma que las FER supongan el 20% de la energía primaria producida para 2020 y el 10% de la energía gastada en el sector de transpor-

te. En España, el Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE) ha presentado el Plan de Acción Nacional de Energías Renovables (PANER) 2011-2020, desarrollando la directiva europea antes mencionada. Para alcanzar los objetivos finales de dicha directiva, el PANER sugiere una evolución de producción y consumo de energía bruta que suponga una participación de fuentes renovables del 40% de la electricidad producida en 2020, así como un 13,6% de incidencia de di-

chas fuentes en la energía consumida en transporte, y un 18,6% de incidencia de dichas fuentes en el sector de calefacción y refrigeración (objetivo global: el 22,7% de la energía primaria producida debe ser de fuentes renovables). En el sector de transportes el consumo de energía FER pasaría de 1.802 a 3.885 ktep (de las que 252 ktep deberían producirse a partir de biocarburantes, con un aumento de su incidencia del 500% respecto a la situación actual)<sup>(3)</sup>. En la Unión Europea y den-



**Figura 1.** El sol como fuente de energía. Fósil, ayer, y renovable, hoy.

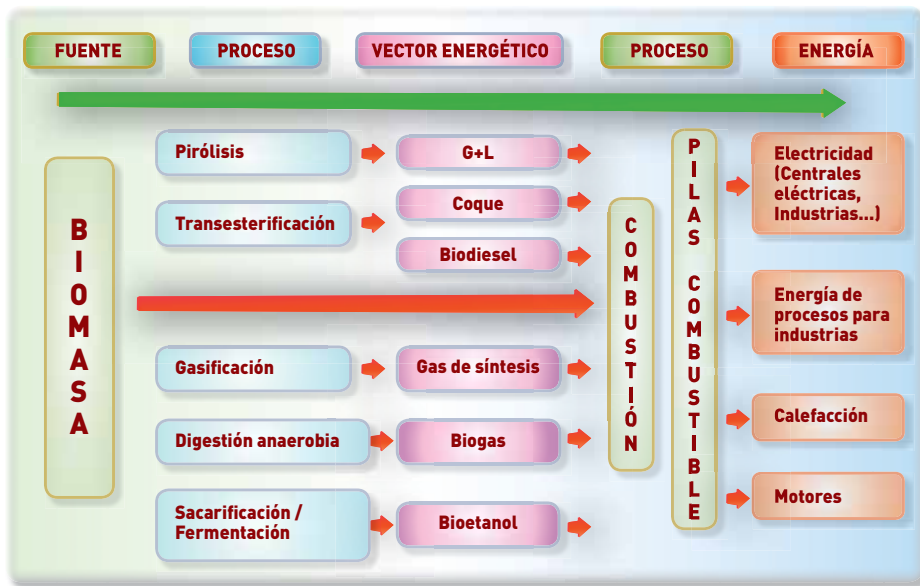


Figura 2. Resumen de procesos de movilización y uso energético de biomasa.

tro del séptimo Programa Marco de Investigación, Desarrollo y Evaluación (FP7), se dedican más de 10.000 millones de euros a áreas como energía, transporte, medio ambiente y biotecnología, incidiendo los proyectos aprobados en este último campo preferentemente en la obtención de biomasa mejorada para la producción de energía <sup>[4]</sup>.

En los últimos años, a pesar de los miles de millones de euros invertidos en plantas basadas en biocarburantes de primera generación, la materia prima más interesante para obtener bioetanol y biodiésel, los principales biocarburantes, ya no son el maíz, la colza, la soja y otras plantas de uso alimentario, sino cultivos agroenergéticos de arbustos (jatrofa, ricino y otros), árboles modificados para un rápido crecimiento (álamos, eucaliptos, etc.) y crecimiento de biomasa microbiana (en especial, por su alto contenido en lípidos, las microalgas) <sup>[5-8]</sup>. Estos cultivos, junto con tecnologías térmicas y catalíticas basadas en catalizadores sólidos, son la base de nuevas posibilidades tecnológicas para la obtención de biodiésel y bioetanol basada en la utilización térmica y ca-

talítica del material lignocelulósico y microbiano, sin competir por suelo necesario para la producción de alimentos (Figura 2). Así se están creando paulatinamente nuevos biocarburantes de segunda, tercera e, incluso, cuarta generación. Estos últimos se basan en la utilización de árboles y microalgas modificadas genéticamente y también estarían orientados a la captura de dióxido de carbono con una efectividad entre un 30 y un 40% mayor que las especies actuales. La selección de la materia prima, del tratamiento térmico y catalítico, y de los procesos de purificación es vital, junto con la subida de los precios del barril de crudo, para que en algún momento los biocarburantes tengan viabilidad económica *per se*, en ausencia de ayudas fiscales. En estas primeras décadas de desarrollo tecnológico, sin embargo, solo un fuerte impulso

económico y una fiscalidad adecuada pueden ayudar a la implantación de este tipo de combustibles <sup>[9]</sup>.

Las principales ventajas ambientales de la utilización de biocombustibles se basan en que su producción ayuda a cerrar el ciclo de carbono al utilizar CO<sub>2</sub> y luz para producir la materia prima de partida. En el caso de las microalgas, esto es especialmente cierto, ya que podrían utilizarse para captar el dióxido de carbono de plantas de producción de energía o de consumo intensivo de la misma. Además, al crecer hasta densidades celulares muy altas (>200 g/L) con contenidos lipídicos medios a altos (un 40-50% de la biomasa seca) en volumen y no en superficie, su uso del espacio es muy notable y la productividad posible es extraordinaria comparada con las mejores plantas oleaginosas (>20 veces más que la palma). Tanto es así que varias previsiones de la evolución del mercado energético pronostican un crecimiento exponencial tanto del bioalcohol como del biodiésel de microalgas, siendo estos los principales biocombustibles que se prevé dominen el mercado para 2040. Los mayores problemas que limitan hoy en día su viabilidad económica están asociados a la eliminación de agua y a la extracción específica de los triglicéridos, por una parte, y a la necesidad de una alta productividad de triglicéridos con un perfil de ácidos grasos adecuados, por otra parte <sup>[10, 11]</sup>.

Hoy en día la mayor parte de las plantas de producción de biocarburantes (bioetanol y biodiésel, sobre todo) se basan en el empleo de procesos clásicos y bien conocidos en la industria alimentaria. En

**La microalga *Chlorella prototecoides* es capaz de producir hasta un 40-50% de su peso seco de un aceite con una composición muy rica en ácidos oleico, linoleico y esteárico, muy similar al del aceite de oliva de la variedad arbequina**



el caso del bioetanol, la sacarificación se hace por vía enzimática, con amilasas y enzimas similares que actúan sobre el almidón, y por vía ácida. La glucosa obtenida es empleada en fermentaciones con levaduras del género *Saccharomyces* para obtener soluciones acuosas de etanol que son tratadas por destilación para obtener el bioetanol. La utilización de biomasa lignocelulósica para bioetanol de segunda generación supondrá el empleo de nuevos procesos térmicos, ácidos y enzimáticos (empleándose xilanasas, lacasas y celulasas en este último caso) [7]. Para obtener biodiesel de primera generación se suelen usar catalizadores ácidos para tratar los ácidos grasos libres, y catalizadores básicos (como sosa y potasa) para transesterificar los aceites con metanol y etanol, preferentemente, obteniéndose metil- o etilésteres de los ácidos grasos, respectivamente, y glicerina como subproducto. El uso de catalizadores homogéneos, que se disuelven en la mezcla líquida en reacción, supone la presencia de reacciones laterales y la producción de jabones. Tras la recuperación del alcohol empleado, por destilación, se necesita un tren de lavado exhaustivo con gran gasto de agua que permita la obtención de un biodiésel que cumpla la normativa (DIN E51106 en Europa y ASTM D-6751-3 en Estados Unidos) y de una glicerina grado farmacéutico o USP apta para los usos que tiene ahora este polirol en el mercado (cosmética, farmacéutica, química fina, etc.) [12].

Frente al proceso habitual de catálisis homogénea con hidróxidos o alcóxidos, desde finales de los años noventa se han investigado y desarrollado nuevas posibilidades: catálisis heterogénea basada



Latinstock

en alcóxidos alcalinotérreos y en óxidos mixtos, catálisis enzimática con lipasas inmovilizadas (heterogénea, por tanto) y procesos térmicos en estado supercrítico. En lo relativo a la catálisis heterogénea clásica se pueden emplear resinas ácidas para la esterificación de los ácidos grasos presentes en aceites de fritura y aceites de baja calidad, seguidas de catalizadores básicos soportados o máscicos. En la actualidad, la empresa de ingeniería Technip ha construido en Sete (160.000 tm biodiésel/año) y está construyendo plantas para la empresa Diester en Francia basadas en catálisis heterogénea, en concreto en el proceso comercializado por Axens (Axens Esterfip H). Este proceso fue desarrollado en primer lugar en el Instituto Francés del Petróleo y está basado en el uso de un óxido mixto de dos metales no nobles. Un resultado, por citar una característica notable, es que la glicerina que se obtiene a salida del reactor tiene un 98% de pureza, en lugar del 80% que es habitual en los procesos ba-

sados en catálisis homogénea. Este tipo de plantas son más simples (menos unidades de purificación) y más rentables que las plantas basadas en catalizadores homogéneos, según varios estudios de simulación de procesos y estimación económica y la experiencia acumulada en los últimos cuatro años [13-16].

Una línea de trabajo propia de la biorrefinería biotecnológica es la basada en catálisis enzimática. En realidad, no es muy novedosa en cuanto a que las lipasas se conocen y se aplican como enzimas sintéticas (catalizadores para síntesis orgánica) desde principios de los años noventa [17]. No obstante, desde 2004-2005 se han desarrollado nuevas estrategias que permiten superar el principal escollo en la aplicación de lipasas como Novozym 435, Lypozyme RMIM o Lypozyme TLIM: su estabilidad en proceso, que se ha extendido de horas a meses, mediante la utilización de cosolventes y agentes acilantes estabilizantes [18, 19]. Algunos trabajos actuales se centran en la utilización de

**Este trabajo analiza la síntesis de biodiésel a partir de este aceite en un sistema con importantes novedades respecto a los convencionales. Utiliza como catalizador una mezcla de enzimas con el objetivo de maximizar la conversión y reducir el coste y como agente metilante, acetato de metilo para minimizar la desactivación enzimática**

nuevas enzimas de Novozymes (el proyecto es una colaboración entre el grupo del profesor J.M. Woodley y Novozymes A/S) en un sistema de dos reactores en tándem, uno para transesterificación del aceite y otro para esterificación de ácidos grasos que pueda haber en la materia prima. Este grupo de trabajo ha demostrado que la utilización del soporte adecuado para la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* da lugar a la mejora del tiempo de reacción de 24 a 6 horas, al evitar la acumulación de glicerina en las proximidades de la enzima. Así, se puede ir mejorando la actividad de las lipasas hasta alcanzar

la de catalizadores heterogéneos como los óxidos mixtos antes mencionados, especialmente si se optimizan las condiciones de trabajo <sup>[19-21]</sup>.

También se están probando tecnologías basadas en el uso de fluidos supercríticos. Si se alcanzan condiciones de operación superiores al punto crítico del alcohol que actúa como agente acilante (241 °C y 60,6 atm para el etanol y 240 °C y 79,8 atm para el metanol), la transesterificación transcurre en apenas unos minutos hasta conversiones superiores al 99% a biodiésel <sup>[22]</sup>. Sin embargo, su viabilidad económica está lastrada por la

necesidad de grandes cantidades de agente metilante (relaciones molares mayores a 40:1 respecto al aceite) y por las altas presiones y temperaturas requeridas, que suponen un coste considerable de operación y de inversión inicial en equipos <sup>[23]</sup>. Este problema se puede reducir considerando la utilización de dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>SC) cuyas propiedades críticas son más moderadas (31 °C y 74 atmósferas) y su efecto estabilizador es similar al del hexano o al del acetato de metilo. En la Tabla 1 se muestran resultados obtenidos por varios autores con aceites de primera y se-

**Tabla 1.** Resumen de resultados descritos en la bibliografía, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico y enzimas como catalizadores.

Materia prima	Agente	Enzima acilante	Relación peso enzima/aceite	Relación molar agente acilante/aceite	P [bar]	T [°C]	Tiempo [h]	Conversión [%]
Aceite mostaza	metanol	Novozym 435	10 mg enzima	3:1	100	50	24	70
Aceite mostaza	etanol							68
Aceite sésamo	metanol							55
Aceite sésamo	etanol							49
Aceite de girasol	metanol	Novozym 435	30% peso	5:1	68 inicial >73,8 reacción	45	6	23
	etanol							27
Aceite de oliva	metanol	Lipasa B <i>Candida antarctica</i>	20% peso	3:1	130	45	6	65,18
Aceite de soja								58,95
Aceite de colza								61
Aceite de girasol								50
Aceite de palma								60
Aceite de soja	metanol	Lipasa <i>Candida rugosa</i> Lipasa <i>Rhizopus oryzae</i> Relación peso 1:1	20% peso	4:1	130	45	3	99,13
Aceite de ricino	metanol	Novozym 435	20% peso	5:1	68 inicial	50	12	45
	etanol					38		
Aceite de palma	metanol	Novozym 435	30% peso	5:1	68 inicial	45	8	51
	etanol							69
Aceite de cacahuete	metanol							45
	etanol							58
<i>Pongamia pinnata</i>	metanol	Novozym 435	30% peso	5:1	68 inicial	45	8	38
	etanol							42
<i>Jatropha curcas</i>	metanol	Novozym 435	30% peso	5:1	68 inicial	45	8	38
	etanol							41

gunda generación en este medio <sup>[24-29]</sup>. Se puede ver que la selección adecuada de enzimas y otras condiciones de operación lleva a conversiones elevadas en condiciones de reacción moderadas (45° C y 130 atmósferas) a tiempos de operación similares a los requeridos para catalizadores heterogéneos básicos <sup>[27]</sup>.

Desde el punto de vista técnico, existen otras ventajas de interés en el uso de este codisolvente supercrítico: no se afecta por la presencia de agua, reduce la viscosidad de la mezcla de reacción, no deja residuo en los productos obtenidos y el proceso se puede simplificar puesto que la separación posterior del biodiésel se puede realizar mediante manipulaciones en las condiciones de operación.

### Objeto y alcance

En el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid se ha comenzado a investigar un proceso para la síntesis de biocombustibles alternativo a los actuales, que resuelve las principales limitaciones de los mismos. El proceso utiliza como generadora de biomasa para la producción del aceite de partida la microalga *Chlorella protothecoides*, porque, heterótrofamente, este microorganismo es capaz de asimilar carbono orgánico (por ejemplo de residuos), sintetizando rápidamente un gran contenido de lípidos (hasta un 55% en peso).

**Tabla 2.** Composición de los aceites de la microalga *Chlorella protothecoides* y de oliva variedad arbequina.

Ácido graso	Aceite de oliva (variedad arbequina) <sup>[30]</sup>	Aceite de <i>Chlorella protothecoides</i> <sup>[31]</sup>
Palmítico (C <sub>16:0</sub> )	14,10 ± 1,10	12,94
Palmitoleico (C <sub>16:1</sub> )	1,77 ± 0,57	–
Margarico (C <sub>17:0</sub> )	0,11 ± 0,03	–
Margaroleico (C <sub>17:1</sub> )	0,26 ± 0,04	–
Estearico (C <sub>18:0</sub> )	1,74 ± 0,18	2,76
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	68,90 ± 3,30	60,84
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	11,60 ± 1,80	17,28
Linolénico (C <sub>18:3</sub> )	0,61 ± 0,07	0,00
Araquídico (C <sub>20:0</sub> )	0,37 ± 0,02	–
Gadoleico (C <sub>20:1</sub> )	0,31 ± 0,02	–
Behénico (C <sub>22:0</sub> )	0,12 ± 0,01	–
Lignocérico (C <sub>24:0</sub> )	0,03 ± 0,00	0,00

Este estudio se centra en la síntesis de metilésteres de ácidos grasos (biodiésel) a partir del aceite sintetizado por esta microalga utilizando lipasas inmovilizadas como catalizador y acetato de metilo como principal agente metilante debido a su poder estabilizador de la enzima, combinado con una pequeña proporción de metanol, que actúa como activador especialmente en el ataque a los diglicéridos. Esta posibilidad ya se probó en el estudio de Talukder y col., donde se obtuvieron buenos resultados con dicho sistema, alcanzando rendimientos del 95% en biodiésel <sup>[19]</sup>.

El estudio se hace en dos sistemas de producción alternativos. Primero, en exceso de acetato de metilo, que actuaría, además de como reactivo, como disolvente, y luego, en presencia de CO<sub>2</sub>SC como codisolvente. El esquema de la reac-

ción se muestra en la Figura 3. La reacción que se produce entre el aceite y el acetato de metilo es de interesterificación, y además de biodiésel, se produce triacetín. Este compuesto es un excelente aditivo para el biodiésel, pues mejora su comportamiento en frío. Por tanto, no es necesaria su eliminación completa en el producto final.

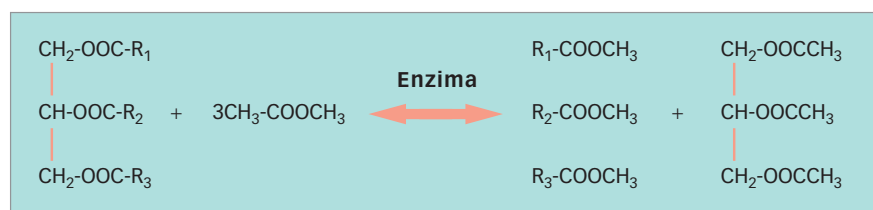
Los objetivos concretos del estudio son:

- Optimizar las condiciones de trabajo para operar con máxima concentración de reactivos y catalizador.
- Llevar a cabo experimentos de síntesis en condiciones similares para un sistema que utiliza dióxido de carbono supercrítico, con vistas a su utilización en continuo.

### Materiales y metodología

#### Reactivos

El aceite de interés es el producido por la microalga *Chlorella protothecoides*. Sin embargo, dada su enorme similitud con el aceite de oliva variedad arbequina (Tabla 2), este se utiliza como aceite modelo en los experimentos <sup>[30,31]</sup>. Como agentes metilantes se usan acetato de metilo



**Figura 3.** Esquema de la reacción de síntesis de biodiésel cuando se emplea acetato de metilo como agente metilante.

(pureza del 99%), de Acros Organics, y metanol, procedente de la casa Sigma-Aldrich, (pureza del 99,9%).

### I Catalizador

Según la literatura consultada, de los tres tipos de enzimas más utilizadas (Novozym 435, Lipozyme TL IM y Lipozyme RM IM), se consiguen velocidades mayores cuando se trabaja con Novozym 435. Como contrapartida, el rendimiento a FAMES es menor. Por tanto, se propone utilizar una mezcla de enzimas, amablemente donadas por Novozymes A/S: Novozym 435 y Lipozyme TL IM,

aprovechando así las ventajas de cada una de ellas.

### I Métodos de síntesis de biodiésel

#### Síntesis de FAMES en ausencia de codisolventes

Las reacciones se llevan a cabo en matraces redondos de 250 ml de capacidad que sirven de reactores discontinuos. Estos matraces se colocan en un StarFish TM, que tiene como base una placa agitadora y calefactora. El equipo tiene capacidad para albergar hasta cinco matraces (Figura 4a). Los ensayos se reali-

zan a 600 r.p.m. de velocidad de agitación, por ser la máxima velocidad que el sistema permite antes de desestabilizarse. En cuanto al imán, se utiliza uno en cruz, ya que se ha visto que es el adecuado para reducir problemas de abrasión. Con el fin de evitar pérdidas por evaporación de los agentes metilantes, a cada matraz se le acopla un refrigerante Dimroth. La toma de muestra se debe realizar con aguja de precisión por una boca lateral a través de un «septum».

Se preparan las cantidades necesarias de aceite y de agentes metilantes (acetato de metilo, metanol). Como se estudia la influencia de la cantidad de agente metilante y el porcentaje de enzimas, las cantidades de los reactivos y enzimas cambian según el experimento que se lleve a cabo. Sin embargo, todos los ensayos se realizan teniendo en cuenta que el volumen final de reacción es el correspondiente a 50 ml de reactivos.

A continuación, se conecta el equipo, fijando la temperatura deseada. Cuando el sistema ha alcanzado la temperatura de reacción, se agregan los reactivos al matraz redondo que actúa como reactor discontinuo, y este se coloca en la placa. Se dejan transcurrir diez minutos para asegurar que los reactivos hayan alcanzado esta misma temperatura. En ese momento, se añaden las enzimas y comienza a contabilizarse el tiempo de reacción.

Durante la primera hora se toman tres muestras de 1 ml. Los tiempos a los que se cogen son: 15, 30 y 60 minutos. Transcurridas 20 horas, se vuelve a tomar muestra, también de 1 ml. La última muestra corresponde a un tiempo total de 24 horas. La razón de tomar un mayor número de muestras al inicio de la reacción se debe a que, precisamente, es en ese momento cuando más rápido transcurre la reacción, por lo que de esta manera se facilita el seguimiento de la misma. Todas estas muestras son tomadas por la parte

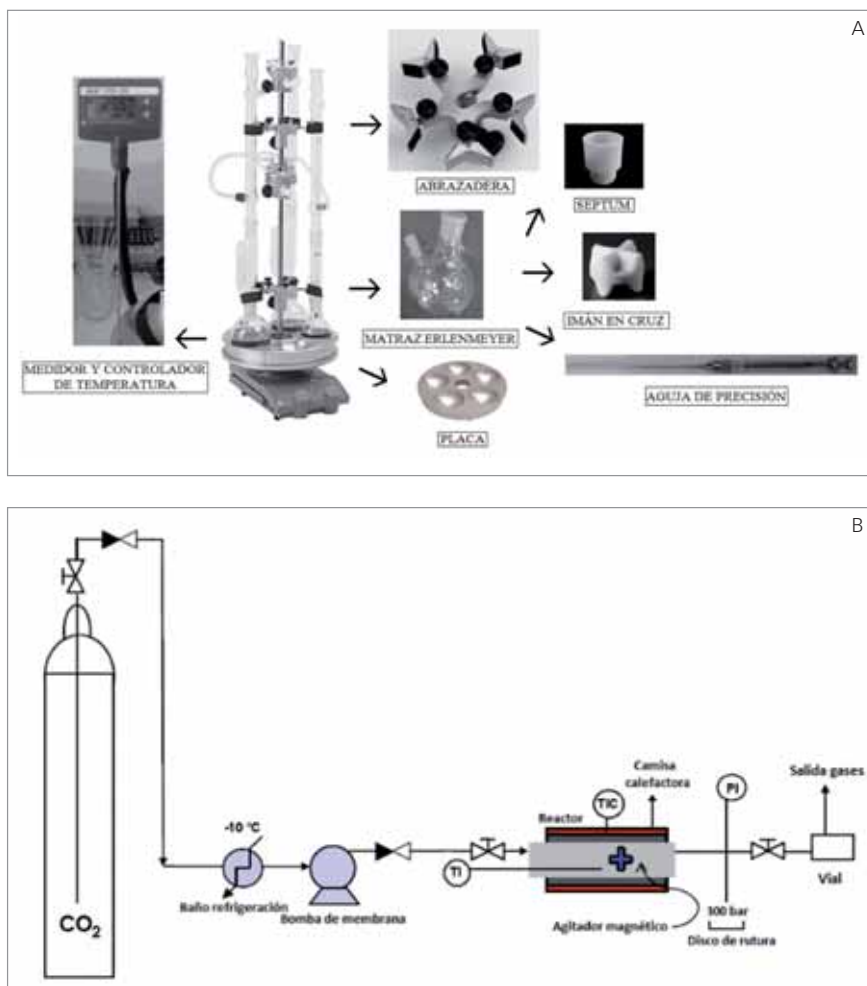


Figura 4. Esquemas de los equipos de síntesis empleados: a) en ausencia de disolventes y b) usando CO<sub>2</sub> supercrítico como disolvente.



superior del reactor utilizando una aguja de precisión. Una vez que se ha tomado la última muestra, se apaga el equipo y se limpian los Erlenmeyer con acetona.

### **Síntesis de FAMEs con CO<sub>2</sub> supercrítico como codisolvente**

La reacción tiene lugar en un reactor tubular de acero inoxidable 316 de 20 mL de volumen que opera en discontinuo (Figura 4b). El aceite, el acetato de metilo y el metanol se introducen en el reactor con la ayuda de una jeringuilla y sobre ellos se añaden las enzimas. Se introduce también un agitador en forma de cruz y se cierra el reactor. Se utiliza una placa agitadora (Elmulab LTD) con agitación controlada a 1.500 rpm para mover el imán. En primer lugar, se abre el paso de CO<sub>2</sub> y se hace una primera presurización hasta la presión de botella (aproximadamente 50 bar). Se coloca la camisa calefactora y se inicia el incremento de temperatura hasta las condiciones de operación de 40 °C. Una vez que la temperatura se ha estabilizado ( $\pm 2$  °C), se bombea CO<sub>2</sub> con una bomba Jasco 2080 Plus hasta que el reactor alcanza la presión de 250 bar. La reacción transcurre en estas condiciones durante un tiempo preestablecido: algunos minutos para los experimentos a tiempo cero y 24 horas para los experimentos de síntesis.

Una vez terminada cada reacción, se comienza lentamente la despresurización. Los productos arrastrados durante la despresurización se recogen en un vial a la salida de la conducción de escape de gases para posterior análisis.

### **Métodos de análisis químico Resonancia magnético nuclear de protón (1H-RMN)**

Previamente al análisis de las muestras se procede a la eliminación del agente metilante residual, ya que interfiere con los metilésteres de los ácidos grasos (FA-



MEs) que constituyen el biodiésel. Esta operación se lleva a cabo por arrastre mediante un chorro de aire que incide sobre la superficie líquida de la muestra. El tiempo de operación está en función del grado de conversión del aceite ya que, a medida que el aceite reacciona, disminuye la cantidad de acetato de metilo y metanol que hay que eliminar. Para tener constancia de que se ha eliminado realmente todo el agente metilante, es necesario asegurarse de que la pesada de la muestra es constante.

Una vez que se ha conseguido evaporar todo el agente metilante de la muestra, se procede a su análisis mediante resonancia magnética de protón (1H-RMN). El área de una señal de resonancia de este tipo es proporcional al número de núcleos por molécula que producen la señal y a la concentración del compuesto en el que están incluidos, lo que permite su integración y la cuantificación del compuesto de interés <sup>[32]</sup>.

El análisis se realiza a una frecuencia de trabajo de 300 MHz, con un espectrómetro Bruker AC-300 con autoinyector del C.A.I de Resonancia Magnética Nuclear de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras se preparan con 10  $\mu$ l de muestra en 700  $\mu$ l de cloroformo deuterado. Se sigue el aumento de la señal a desplazamiento 3,5, propia del grupo metilo de los FAMEs, además de la señal a desplazamiento 3,6-4,0, propia de los triglicéridos que constituyen el aceite. Dichas señales se refieren siempre al patrón interno, en este caso la señal de los protones asociados a los dobles enlace C=C que hay en las cadenas de los ácidos grasos insaturados. Esta señal es constante independientemente de en que molécula se encuentre dicha cadena.

Este tipo de análisis se ha empleado en la optimización de la síntesis sin codisolventes, centrándose en el rendimiento a FAMEs a 24 horas.



Lairistock

## Se obtiene un 80% de conversión a FAMES en 24 horas a 50° C, con una mezcla 1:1 en peso de Novozym 435 y Lipozyme TLIM, con un 7% en peso de enzima respecto a aceite y una relación acetato de metilo:aceite de 7:1

acetonitrilo, y esta composición se mantiene hasta los 20 min. Posteriormente, de 20 min a 30 min, el disolvente alcanza progresivamente una composición del 50% de acetonitrilo y el otro 50% de la mezcla de isopropanol y hexano. Estas concentraciones se mantienen constantes hasta los 50 min. De 50 min a 60 min, se va alcanzando una composición del 90% de acetonitrilo y del 10% de la mezcla. Por último, de 60 min a 70 min, el eluyente está formado por un 90% de acetonitrilo y un 10% de agua milliQ. El caudal del eluyente es de 0,75 mL/min.

Los componentes arrastrados por el disolvente se analizan en un detector Diodo de Array (Jasco MD-2015 Plus), que mide a longitudes de onda de 205 nm, 215 nm y 220 nm, eligiéndose la primera para cuantificar los compuestos implicados por la mayor sensibilidad demostrada. Para la cuantificación se utilizan calibrados externos de concentración frente a altura de trioleína para los picos de aceite, y de concentración frente a área para los picos de metilésteres de oleico, linoleico y esteárico.

Este análisis se puso a punto y se aplicó con las muestras obtenidas en los experimentos con CO<sub>2</sub> supercrítico como disolvente.

vozym 435 y Lipozyme TLIM) en la mezcla que se usa como catalizador, cantidad de enzima total y la relación agente metilante/aceite<sup>[18, 19, 21, 26, 27, 31]</sup>.

La mayoría de los trabajos realizados en sistemas similares empleaban temperaturas comprendidas entre 25 y 60° C, siendo el intervalo más habitual entre 30 y 50° C. Esto se debe a que, en principio, un aumento de esta variable favorece la reacción aunque, llegado cierto límite, puede provocar la desactivación de la enzima. Por ello, se eligió dicho rango de valores para estudiar este factor, fijándose tres niveles: 30, 40 y 50° C.

Por otro lado, la mayor parte de los estudios se han realizado empleando una sola enzima. Sin embargo, se optó por usar una mezcla de enzimas donde los beneficios podrían ser dobles<sup>[21, 27]</sup>: por un lado, se sabe que Novozym 435 es más específica a las posiciones 1 y 3, con lo que se pretende que Lipozyme TLIM, al ser inespecífica, ataque a la posición 2 del triglicérido; por otra parte, el coste de Novozym 435 es muy superior al de Lipozyme TLIM, por lo que, de obtener resultados positivos, podría reducirse notablemente el coste del catalizador. Así, se seleccionaron los siguientes niveles de porcentaje de Novozym 435 respecto al total de la enzima: 25, 50 y 75.

Además, la cantidad de enzima total necesaria suele encontrarse en el rango 2–20% de aceite en peso, tomando por lo general valores entre 4 y 10%<sup>[10, 14, 17]</sup>. En consecuencia, los niveles escogidos se localizaron en este último intervalo, correspondiéndose con los valores de 5, 7 y 10%.

Respecto al agente metilante (mezcla de metanol y acetato de metilo), se toma

### Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC)

El método de análisis empleado se desarrolló a partir del método de Holcapek y col.<sup>[33]</sup>. Primero se centrifugan los productos recogidos en el vial para separar las fases presentes en la misma. A continuación, se recogen 10 µL de la fase superior y se diluyen con 990 µL de tetrahidrofurano. La muestra así preparada se somete a un análisis HPLC, que utiliza una columna Mediterránea C18, de 150 4,6 mm (ancho externo) y con un diámetro de partícula de 3 µm. Además, esta columna cuenta con un filtro y una precolumna. La temperatura del horno en el que se encuentra la columna es de 25 °C.

Como eluyentes se empleó una mezcla de isopropanol y hexano con una relación en volumen 5:4, acetonitrilo y agua milliQ. Se inicia el método de análisis empleando un 90% de acetonitrilo y un 10% de agua milliQ. A tiempo 15 min, el eluyente está constituido en un 100% por

## Resultados y discusión

### Optimización para síntesis sin codisolventes

Los factores que afectan a la catálisis enzimática de biodiésel a partir de aceites con mayor influencia son, en general, los siguientes: temperatura, proporción de las enzimas (en este caso No-

**Tabla 3.** Resultados de los experimentos de optimización de condiciones de operación para la síntesis de FAMES en ausencia de codisolventes.

Experim.	Factores				Rendimiento (%)
	T (°C)	% N435	% enzimas	AcMe:aceite	
1	50	75	10	5	64,7
2	30	75	10	5	65,9
3	40	75	10	5	59,8
4	50	25	10	6	69,9
5	30	25	10	6	79,2
6	40	25	10	6	73,5
7	50	50	10	7	58,0
8	30	50	10	7	75,0
9	40	50	10	7	71,2
10	50	75	5	5	76,1
11	30	75	5	5	57,3
12	40	75	5	5	71,3
13	50	25	5	6	54,0
14	30	25	5	6	66,7
15	40	25	5	6	76,1
16	50	50	5	7	76,9
17	30	50	5	7	71,0
18	40	50	5	7	59,7
19	50	75	7	5	68,7
20	30	75	7	5	77,3
21	40	75	7	5	64,8
22	50	25	7	6	69,9
23	30	25	7	6	67,4
24	40	25	7	6	64,6
25	50	50	7	7	80,2
26	30	50	7	7	65,3
27	40	50	7	7	63,5

como base el trabajo de Talukder y col., en el que se decide emplear siempre una relación molar aceite:metanol de 1:1 [19]. Según los autores, esta proporción es la óptima para evitar, en la medida de lo posible, la desactivación de la enzima y, a la vez, beneficiarse del aumento de la velocidad de reacción que lleva asociado el uso de metanol. En este mismo estudio, se analizan también distintas relaciones acetato de metilo/aceite, concretamente: 3:1, 4:1, 6:1, 8:1 y 12:1, consiguiendo los mejores resultados con la proporción 8:1 [16]. Aplicándolo al caso de interés, la zona de estudio se localizó en los niveles 5:1, 6:1 y 7:1.

Elegidas las variables y niveles, se planteó un diseño factorial fraccionado que permitió reducir el número de experimentos de un diseño clásico. La notación que se sigue para este tipo de diseños es nk-p, donde n es el número de niveles, k el número de factores con los que se va a experimentar, y p el grado de frac-

cionamiento. Como se ha comentado, se escogieron tres niveles para los cuatro factores de estudio, y un grado de fraccionamiento 1. De esta manera, el diseño sería del tipo 34-1, es decir, un diseño que permite estudiar cuatro factores en 27 experimentos.

Los resultados de conversión a 24 horas (ver Tabla 3) muestran que la mejor producción con un 80% de conversión a FAMES se obtiene para el experimento realizado a 50° C, con una mezcla 1:1 en peso de Novozym 435 y Lipozyme TLIM, con un 7% en peso de enzima respecto a aceite y una relación acetato de metilo:aceite de 7:1. Este resultado es lógico teniendo en cuenta lo obtenido por otros autores y el hecho de que un exceso de agente metilante supone una dilución del aceite que ya reduce la velocidad de reacción y la productividad.

El trabajo también pone de manifiesto que temperaturas demasiado altas suponen desactivación enzimática y que las dos enzimas son complementarias y necesarias para un máximo rendimiento a biodiésel (lo cual también se demuestra para el par de lipasas *Candida rugosa*: *Rhizopus oryzae* empleado en condiciones supercríticas en el trabajo de Lee y col. [27]).

Además, los resultados obtenidos se pueden representar en gráficas con superficies de respuesta, tras relacionar la variable «rendimiento a FAMES a 24 h» con las variables independientes antes mencionadas. De esta correlación surge la ecuación que relaciona el rendimiento (la función objetivo seleccionada) con las variables de operación:

$$Y = -3,08 - 2,55 \cdot x_1 + 4,59 \cdot x_2 - 13,77 \cdot x_3 + 14,29 \cdot x_4 - 0,04 \cdot x_1 \cdot x_2 - 0,03 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,01 \cdot x_1 \cdot x_4 - 0,57 \cdot x_2 \cdot x_4 + 2,37 \cdot x_3 \cdot x_4 + 0,07 \cdot x_1^2$$

, donde el subíndice 1 designa la temperatura, el 2 la proporción de Novozyme a enzima total, el 3 el porcentaje de enzima y el subíndice 4 la relación acetato de metilo/aceite.

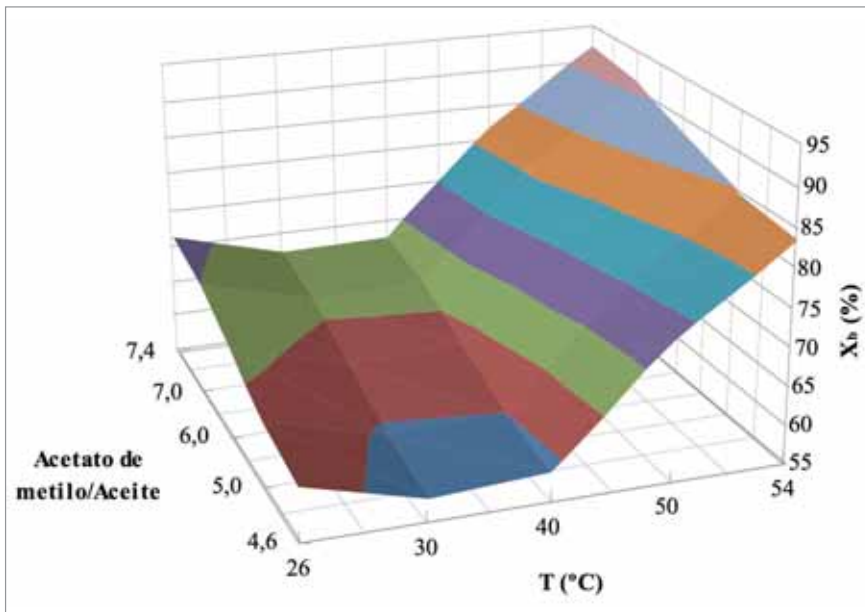


Figura 5. Efecto de la temperatura y de la relación entre reactivos en la conversión ( $X_b$ ) a biodiésel.

Esta ecuación sirve para poder dibujar las superficies de respuesta (de las que una muestra se da en la Figura 5) y corroborar las condiciones óptimas de operación discutidas.

Los resultados conseguidos pueden compararse con los obtenidos en otros trabajos a través de la Tabla 4, que recoge, a grandes rasgos, las similitudes de otras investigaciones con la propia. El trabajo aquí reflejado es una alternativa de interés, puesto que se podrían alcanzar resultados del mismo orden que otros autores, pero empleando menor cantidad de Novozym 435 con respecto al total de catalizador, lo que conlleva una reducción del coste, factor determinante a la hora de evaluar la viabilidad de un proceso. Además, se consigue reemplazar el metanol en un alto grado, pudiéndose reutilizar la enzima al evitar el efecto desactivador del alcohol.

### ■ Síntesis con $\text{CO}_2$ supercrítico como codisolvente

Una vez conocidas las condiciones mejores sin añadir codisolventes a la mez-

cla de reacción, se llevaron a cabo varios experimentos utilizando dióxido de carbono supercrítico.

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon las mejores condiciones halladas en la etapa anterior, es decir, como agente metilante se empleó una mezcla de acetato de metilo en relación molar 7:1 respecto del aceite, y como catalizador, una mezcla de las enzimas en una relación en peso 1:1 entre ellas y del 7% respecto del aceite de oliva.

La cantidad de agentes metilantes fue de un 10% en peso respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$ . Esta relación se fijó para asegurar la total solubilización del aceite en la mezcla  $\text{CO}_2$ -agentes metilantes. Y se

fijó atendiendo a la solubilidad del aceite de girasol en  $\text{CO}_2$  supercrítico, tomando como codisolvente etanol, que, para las condiciones de operación de 250 bar y una temperatura de 40° C, es de 30 g de aceite/kg de  $\text{CO}_2$  [34].

**El uso de dióxido de carbono supercrítico como codisolvente a 250 bar no reduce el rendimiento a FAMES a pesar de la gran dilución respecto a las condiciones en ausencia de este codisolvente, porque rebaja la viscosidad de la mezcla mejorando la difusión de los reactivos**

Los experimentos se llevaron a cabo a esta temperatura porque se consideró que el empleo de condiciones supercríticas estaba orientado a la producción en continuo, tipo de operación que requiere de las condiciones más estables posibles. En estas condiciones, hay que recordar que los rendimientos a FAMES en ausencia de codisolvente estaban en el intervalo 58-65%.

El análisis de las muestras a tiempo cero, a 1 hora, a 24 y a 48 horas (experimentos por duplicado) se llevó a cabo por el método de HPLC en fase reversa

Tabla 4. Resumen de los resultados de rendimiento de biodiésel ( $X_b$ ) conseguidos en este trabajo y por otros autores en ausencia de codisolventes.

Condición experimental relacionada	$X_b$ (%)	Referencia
Intervalo de temperatura: 30 - 50° C	86 - 97	[7, 17-19, 21, 27, 31]
Sistema enzimático: Novozym 435 + Lipozyme TL IM	96 - 97	[21]
Agente metilante: Metanol + acetato de metilo	95 - 96	[19]
Tiempo de reacción: 24 h	84 - 96	[7, 17-19, 21, 27, 31]
Este trabajo	80	-



(RP-HPLC) anteriormente descrito. En la Figura 6 se muestra la evolución de los cromatogramas correspondientes en los que se indican los picos del aceite de partida y los FAMES producto.

Como se observa, el rendimiento a FAMES a las 24 h era del 60%, es decir, similar a los obtenidos en ausencia de  $\text{CO}_2\text{SC}$  y por otros autores con otras enzimas y aceites (Tabla 1), y del 80% a las 48 horas. Este hecho es interesante ya que muestra que la dilución considerable debida al uso del codisolvente (entendiendo que la mezcla de agentes metilantes ya actúa como disolvente, además de como mezcla de reactivos) no frena las reacciones que dan lugar a los ésteres metílicos de ácidos grasos. Es más, se puede intuir un efecto activador considerable, al estar la mezcla de reacción en proporción 1:10 en peso respecto al dióxido de carbono supercrítico a 250 atm y 40° C. Si se acepta una densidad del  $\text{CO}_2\text{SC}$  de 0,3 g/cm<sup>3</sup> a estas condiciones, ello supone una dilución 30 veces mayor a las condiciones sin codisolvente. La razón de este buen resultado

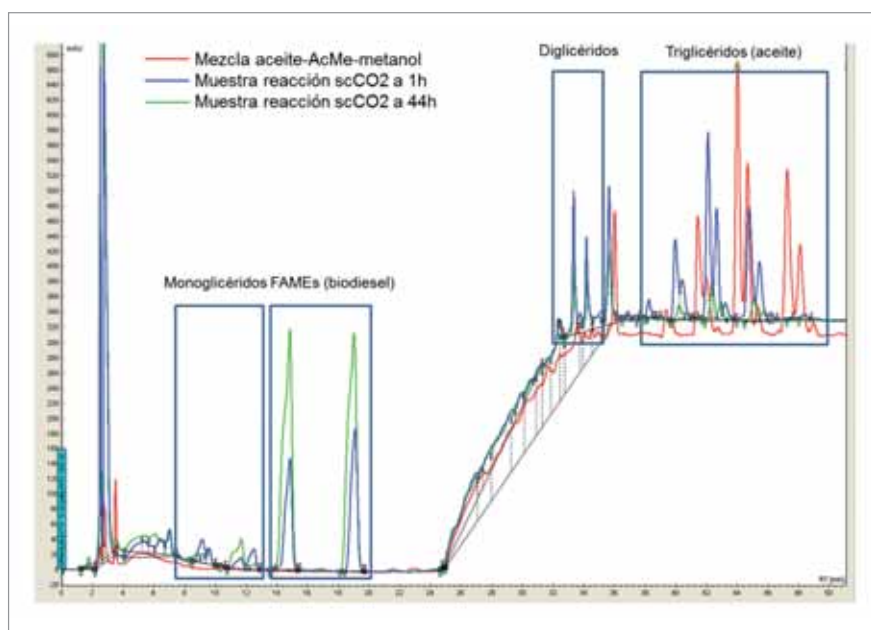


Latinstock

puede estribar en la gran velocidad de difusión en los poros de los catalizadores enzimáticos que se obtiene en condiciones supercríticas (del orden de 1.000 a 10.000 veces superiores a la de los sistemas en ausencia de codisolvente supercrítico). La alta viscosidad de los sistemas líquidos lleva a unas velocidades de transferencia de materia en los poros muy bajas. Los sistemas supercríticos tienen viscosidades varios órdenes de magnitud inferiores (en especial, si se considera la alta

viscosidad del aceite), que explican la alta difusividad en estos sistemas. Esta difusividad elevada contrarrestaría la dilución de los reactivos y llevaría a un rendimiento a biodiésel elevado aún a baja concentración de los mismos.

En estas circunstancias cabría proponer el desarrollo de experimentos en continuo en dióxido de carbono supercrítico en reactores tipo lecho fijo que contengan una mezcla de las dos enzimas empleadas al 50% en peso (concentración de enzima total a medio de reacción en torno al 150%), maximizando hasta donde deje la solubilidad y la difusividad efectiva de los reactivos la concentración de estos en el medio de reacción. Asimismo, sería de utilidad estudiar la estabilidad de tal sistema una vez optimizada su actividad, teniendo en cuenta la gran capacidad de estabilización que tiene tanto el acetato de metilo como el propio  $\text{CO}_2\text{SC}$ .



**Figura 6.** Cromatogramas de RP-HPLC que muestran la evolución temporal de la síntesis de FAMES (biodiésel) en  $\text{CO}_2$  supercrítico.

## Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en los dos sistemas analizados, cabe concluir que:

- Las condiciones óptimas en exceso de acetato de metilo indican que se precisa de temperaturas moderadas, mezclas enzimáticas adecuadas al 50% en

peso, concentraciones globales de enzimas elevadas y relaciones molares de acetato de metilo a aceite que desplazan el equilibrio químico hacia los FAMES pero que no diluyan en exceso el aceite.

■ El uso de dióxido de carbono supercrítico no reduce el rendimiento a FA-

MEs a pesar de la gran dilución respecto a las condiciones en ausencia de este codisolvente. Este hecho se puede deber a la mejora de la difusividad de los reactivos en los poros de los biocatalizadores y a la dilución que sufren tanto el aceite como los agentes metilantes. Por ello, este medio podría ser

adecuado para mejorar la estabilidad del catalizador enzimático en producción en continuo y para facilitar la posterior separación de los productos. ♦

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por FUNDA-CIÓN MAPFRE (Ayudas a la investigación 2011).

## PARA SABER MÁS

- [1] BritishPetroleum. BP Energy Outlook. BP Statistical Review, 2011.
- [2] Hughes, L. y Rudolph, J. Future world oil production: growth, plateau, or peak? *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011. 3(4): p. 225-234.
- [3] IDAE. Plan de Acción Nacional de Energías Renovables de España (PANER) 2011-2020. 2010.
- [4] Cichocka, D., Claxton, J. Economidis, I., Högel, J., Venturi, P. y Aguilar, A. European Union research and innovation perspectives on biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 2011. 156(4): p. 382-391.
- [5] Brennan, L. y Powende, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. 14(2): p. 557-577.
- [6] Wen, Z., Liu, J. y Chen, F. 3.12 - Biofuel from microalgae, in *comprehensive biotechnology* (second edition), M.-Y. Editor-in-Chief: Murray, Editor. 2011, Academic Press: Burlington. p. 127-133.
- [7] Naik, S.N., V.V. Goud, V.V., Rout, P.K. y Dalai, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. 14(2): p. 578-597.
- [8] Cheng, J.J. y Timilsina, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 2011. 36(12): p. 3541-3549.
- [9] Norsker, N.-H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H. y Wijffels, R.H. Microalgal production – A close look at the economics. *Biotechnology Advances*. 29(1): p. 24-27.
- [10] F. Xavier, M. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, 2011. 29(11): p. 542-549.
- [11] Lee, D.H. Algal biodiesel economy and competition among bio-fuels. *Bioresource Technology*, 2011. 102(1): p. 43-49.
- [12] Vicente, G., Martínez, M. y Aracil, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology*, 2004. 92(3): p. 297-305.
- [13] Chouhan, A.P.S. y Sarma, A.K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011. 15(9): p. 4378-4399.
- [14] West, A.H., Posarac, D. y Ellis, N. Assessment of four biodiesel production processes using HYSYS. *Plant. Bioresource Technology*, 2008. 99(14): p. 6587-6601.
- [15] Marchetti, J.M., Miguel, V.U. y Errazu, A.F. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 2008. 89(8): p. 740-748.
- [16] Kiss, F.E., Jovanović, M. y Bosković, G.C. Economic and ecological aspects of biodiesel production over homogeneous and heterogeneous catalysts. *Fuel Processing Technology*, 2010. 91(10): p. 1316-1320.
- [17] Gog, A., Roman, M., Tofla, M., Paizs, C. y Irimie, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, 2012. 39(1): p. 10-16.
- [18] Rodrigues, A.R., Paiva, A., Da Silva, M.G., Simões, P. y Barreiros, S. Continuous enzymatic production of biodiesel from virgin and waste sunflower oil in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011. 56(3): p. 259-264.
- [19] Talukder, M.M.R., Das, P., Fang, T.S. y Wu, J.C. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, 2011. 55(2): p. 119-122.
- [20] Xu, Y., Nordblad, M., Nielsen, P.M., Brask, J. y Woodley, J.M. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011. 72(3-4): p. 213-219.
- [21] Huang, Y., Zheng, H. y Yan, Y. Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010. 160(2): p. 504-515.
- [22] Tan, K.T., Lee, K.T. y Mohamed, A.R. Prospects of non-catalytic supercritical methyl acetate process in biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 2011. 92(10): p. 1905-1909.
- [23] Marchetti, J.M. y Errazu, A.F. Technoeconomic study of supercritical biodiesel production plant. *Energy Conversion and Management*, 2008. 49(8): p. 2160-2164.
- [24] Varma, M.N., Deshpande, P.A. y Madras, G. Synthesis of biodiesel in supercritical alcohols and supercritical carbon dioxide. *Fuel*, 2010. 89(7): p. 1641-1646.
- [25] Madras, G., Kolluru, C. y Kumar, R. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. *Fuel*, 2004. 83(14-15): p. 2029-2033.
- [26] Lee, J., Kwon, C., Kang, J., Park, C., Tae, B. y Kim, S. Biodiesel production from various oils under supercritical fluid conditions by &#x26;Candida antarctica&#x26;; Lipase B Using a Stepwise Reaction Method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009. 156(1): p. 24-34.
- [27] Lee, J.H., Kim, S.B., Kang, S.W., Song, Y.S., Park, C., Han, S.O. y Kim, S.W. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. *Bioresource Technology*, 2011. 102(2): p. 2105-2108.
- [28] Varma, M.N. y Madras, G. Synthesis of biodiesel from Castor oil and Linseed oil in supercritical fluids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006. 46(1): p. 1-6.
- [29] Rathore, V. y Madras, G. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. *Fuel*, 2007. 86(17-18): p. 2650-2659.
- [30] Gracia, M.S., Royo, A. y Guillén, M. Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío. *Grasas y Aceites*, 2009. 60(4): p. 321-329.
- [31] Xu, H., Miao, X. y Wu, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 2006. 126(4): p. 499-507.
- [32] ter Horst, M., Urbin, S., Burton, R. y McMillan, C. Using proton nuclear magnetic resonance as a rapid response research tool for methyl ester characterization in biodiesel. *Lipid Technology*, 2009. 21(2): p. 39-41.
- [33] Holcapek, M.P., Jandera, P., Fischer, J. y Prokes, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A*, 1999. 858(1): p. 13-31.
- [34] Cocero, M. y Calvo, L. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO<sub>2</sub>-ethanol mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996. 73(11): p. 1573-1578.