

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/1
I.S.B.N.: 978-84-15287-90-2

CARLOS MOLINA MAYO

**Estudio de la composición y estabilidad
de biodiesel obtenido a partir
de aceites vegetales limpios
y procedentes de aceites de fritura**

Directores

**ANDREA BRITO ALAYÓN
MARÍA TERESA GARCÍA RODRÍGUEZ
FRANCISCO JIMÉNEZ MORENO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Durante todo este tiempo han sido muchos los buenos momentos que he vivido, pero también han existido etapas de desesperación y de agobio sintiéndome, en ocasiones, como en un tiovivo, unas veces arriba y otras abajo. Aun así, me quedo con un buen recuerdo, porque tanto en los buenos como en los malos momentos siempre he podido contar con diferentes personas, capaces de alegrarse conmigo y dispuestos a ayudarme e intentar encontrar soluciones a problemas que parecían imposibles de solucionar. Por este motivo, me gustaría agradecer a todos los que de una manera u otra han estado a mi lado durante esta etapa de mi vida y sin los cuales no hubiera sido posible encontrarme en estos momentos escribiendo estas líneas.

Por ello, en primer lugar, quiero expresar mi gratitud más sincera a mis directores de Tesis, la Dra. Andrea Brito Alayón, la Dra. María Teresa García Rodríguez y el Dr. Francisco Jiménez Moreno, por depositar su confianza en mí, su paciencia y por enseñarme a fomentar mi espíritu crítico. Sin su asesoramiento y dedicación no hubiese sido posible sacar adelante esta Tesis. Siempre les he considerado grandes investigadores y mejores personas.

A los miembros del grupo de investigación de Catálisis Heterogénea por su disponibilidad, cercanía, atención, enseñanzas y experiencia; simplemente muchas gracias.

A todos los miembros de los Departamentos de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica y de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, por sus palabras de aliento en los pasillos de ambos departamentos y por el apoyo, los consejos y el trato recibido hacia mi persona.

A mis compañeros de laboratorio de la línea de investigación de aceites, en especial a Alejandro, Dayana, Rosa, Mary, Nuria, Gabriel, Isabel, Estefanía, Elisa, Elena, y a Patri, del Laboratorio 5 del Departamento de Analítica, por sus consejos, por hacerme el día a día más agradable, por el apoyo y por las aportaciones y ayudas prestadas en todo momento a lo largo de la realización de esta Tesis.

A los técnicos del laboratorio, Paco, Celia y Loli, que han colaborado en este trabajo de forma eficiente y por las conversaciones mantenidas con las que hemos solucionado el mundo en pocos minutos durante tantas buenas ocasiones.

A Dña. Margarita de la Rosa que, en todo momento, con su disponibilidad y amabilidad, me ha ayudado en las tareas burocráticas con lo que ha facilitado la realización de esta Tesis.

A la Consejería de Educación, Cultura y Deportes y a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Formación (ACIISI) del Gobierno de Canarias por la concesión de una beca para la realización de esta Tesis y las becas para la realización de las estancias breves en la República Checa y en Madrid.

También quiero expresar mi agradecimiento al Departamento de Ciencias de la Universidad de Masaryk (Brno, República Checa), principalmente a los componentes del "*Laboratory of Mass Spectrometry and Separation Methods*" y en especial al Profesor Josef Havel, por acogerme durante mi estancia como un miembro más en el seno de su equipo, sin olvidarme de mis compañeros de laboratorio y, por supuesto, amigos, Jan, Sachin y Reddy. A todos ustedes, muchas gracias por esos pequeños pero, en el fondo, grandes detalles que tuvisteis conmigo en el frío y lluvioso Brno.

A todo el personal del Laboratorio Químico de la Refinería de Petróleos de la Compañía Española de Petróleos S.A. (CEPSA) de Santa Cruz de Tenerife, personalizado en D. Tomás F. Estrella Piñero, como supervisor del laboratorio, por haber puesto sus instalaciones y medios a mi disposición, por la asistencia y colaboración prestada durante el tiempo que pasé con ellos y por el buen trato recibido en todo momento. Muchas gracias por su ayuda.

Mi agradecimiento a todo el personal del Departamento de Ingeniería Civil: Tecnología Hidráulica y Energética de la E.U.I.T. Obras Públicas de la Universidad Politécnica de Madrid, en especial a la Dra. M^a Milagros Bonilla Simón y a la Dra. M^a Ángeles Quijano Nieto por el gran trato y consideración que tuvieron durante mi estancia en Madrid y por la empatía que siempre me han mostrado y que siempre será recíproca. También quisiera agradecer a los compañeros de laboratorio, David, Raúl, y de una forma muy especial a Sara, por todo su apoyo y ayuda.

Quisiera, en este punto, dedicarle esta Tesis de una forma muy especial a la Dra. Bonilla Simón, tristemente fallecida hace algunos meses. Milagros, muchas gracias por todo lo que hiciste por mí y por tus emotivas palabras de apoyo y estímulo.

A mis amigos y amigas que siempre me han ayudado, se han acordado y preocupado por mí, ofreciéndome su apoyo y amistad incondicional.

Deseo agradecer muy especialmente a mis padres (Francisco y Nereida) y a mis hermanos (Francisco y Fernando) por confiar en mí, por su cariño, por enseñarme a luchar por las cosas en las que creo y creer en mí, por su gran paciencia, por transmitirme sensatez, confianza, serenidad y la tranquilidad que he podido necesitar en muchos momentos, por los ánimos que he recibido de ustedes durante toda mi vida y, sobre todo, por “aguantarme” en los momentos de desesperación y de agobio. Todo el mundo sabe el gran mérito que tiene eso. ¡Muchas gracias!

A ti Sara, simplemente tú, conocerte es uno de los muchos motivos por lo que ha valido la pena realizar esta Tesis, porque te he conocido gracias a ella y porque siempre has comprendido la importancia que tiene este trabajo para mí, gracias por tu apoyo incondicional, tanto en los buenos como en los malos momentos, y por tu ayuda y tu enorme paciencia. Gracias por hacerme ver lo positivo de las cosas en mis momentos de negatividad. *“Todo llega para el que sabe esperar”*, ¿verdad?. También quiero expresar mi agradecimiento a mis suegros (Patrocinio y Carmen), por sus palabras de apoyo, ánimo y aliento durante estos últimos años.

A mis abuelos, que han sido muy importantes en mi vida y que sé que, estén donde estén, están muy orgullosos de que haya conseguido llegar hasta aquí. ¡Os quiero!.

Y, por último, quiero agradecer a todas las personas que, de alguna manera, haya contribuido a la realización de esta Tesis y que consiguió, quizás sin saberlo, que confiara un poquito más en mí mismo y no tirara la toalla en el camino.

A los que he nombrado y a los que he olvidado. A todos, muchas gracias.

Carlos Molina Mayo, Julio 2011

A mis abuelos (in memoriam)

A mis hermanos

A mis padres

A Sara

“El deseo de ser diferente de lo que eres es la mayor tragedia con que el destino puede castigar a una persona. Tenemos que conformarnos con lo que somos, y ser conscientes de que a cambio de esta sabiduría no recibiremos ningún galardón de la vida”

SÁNDOR MÁRAI, *El último encuentro*

(1900-1989)

ÍNDICE



RESUMEN	xviii
----------------------	-------

ACRÓNIMOS	xx
------------------------	----

CAPÍTULO I	1
-------------------------	---

INTRODUCCIÓN

<i>1.1 Fuentes de energía y clasificación</i>	5
<i>1.2 Tipos de biocombustibles</i>	6
1.2.1 Biocombustibles sólidos.....	6
1.2.2 Biocombustibles líquidos.....	7
1.2.3 Biocombustibles gaseosos.....	8
<i>1.3 Evolución histórica de los biocombustibles. Crisis energéticas</i>	8
<i>1.4 Biocombustibles: definición y clasificación</i>	13
<i>1.5 Biodiesel: ventajas e inconvenientes</i>	17
1.5.1 Ventajas.....	17
1.5.1.1 Ventajas medioambientales.....	17
1.5.1.2 Ventajas técnicas.....	21
1.5.1.3 Ventajas socioeconómicas.....	22
1.5.2 Inconvenientes.....	22
1.5.2.1 Inconvenientes socioeconómicos.....	22
1.5.2.2 Inconvenientes técnicos.....	23
<i>1.6 Situación actual del biodiesel</i>	24
1.6.1 Situación actual del biodiesel en el mundo.....	24
1.6.2 Situación actual del biodiesel en Europa.....	26
1.6.3 Situación actual del biodiesel en España.....	29
1.6.4 Situación actual del biodiesel en las Islas Canarias.....	34
<i>1.7 Utilización de aceites de fritura como materia prima</i>	36
<i>1.8 Utilización de aceites vegetales como biocombustible</i>	38
1.8.1 Microemulsión.....	39
1.8.2 Pirólisis.....	39
1.8.3 Dilución.....	40
1.8.4 Reacción de transesterificación.....	40
1.8.4.1 Variables que afectan a la reacción de transesterificación.....	41
1.8.4.1.1 Calidad y pureza de las materias primas.....	42
1.8.4.1.2 Tipo de alcoholes.....	42
1.8.4.1.3 Temperatura y tiempo de reacción.....	43
1.8.4.1.4 Naturaleza del catalizador.....	44
1.8.4.1.5 Relación molar alcohol-aceite.....	44
1.8.4.1.6 Grado de agitación.....	45
1.8.4.2 Cinética de la reacción.....	45
1.8.4.2.1 Transesterificación catalítica. Clasificación.....	45
1.8.4.2.1.1 Transesterificación mediante catálisis homogénea alcalina.....	45
1.8.4.2.1.2 Transesterificación mediante catálisis homogénea ácida.....	48
1.8.4.2.1.3 Transesterificación mediante catálisis heterogénea.....	49
1.8.4.2.1.3.1 Catalizadores sólidos.....	49
1.8.4.2.1.3.2 Catalizadores enzimáticos.....	50
1.8.4.2.2 Transesterificación no catalítica.....	51

CAPÍTULO II	53
--------------------------	-----------

OBJETIVOS

CAPÍTULO III	57
---------------------------	-----------

PARTE EXPERIMENTAL

<i>III.1 Reactivos y disoluciones</i>	61
<i>III.2 Equipos e instrumentos</i>	63
<i>III.3 Muestras de aceite</i>	70
<i>III.4 Procedimiento experimental</i>	70
III.4.1 Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) por GC-FID.....	70
III.4.2 Producción de biodiesel mediante catálisis homogénea alcalina.....	72
III.4.3 Caracterización de las muestras de aceite y biodiesel mediante la norma UNE-EN 14214:2009.....	73
III.4.4 Estudio de la estabilidad del biodiesel mediante la determinación del contenido en FAMES por GC-FID.....	84
III.4.5 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES.....	85
III.4.5.1 Determinación del contenido de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel mediante las normas UNE-EN 14107:2003 y UNE-EN 14538:2006.....	85
III.4.5.2 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES.....	86
III.4.6 Caracterización de muestras de aceite y biodiesel mediante MALDI-TOF MS.....	90

CAPÍTULO IV	91
--------------------------	-----------

DETERMINACIÓN DE FAMES EN MUESTRAS DE BIODIESEL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (GC-FID)

<i>IV.1 Antecedentes</i>	95
<i>IV.2 Composición de los aceites y grasas</i>	96
<i>IV.3 Estudios previos para la separación cromatográfica</i>	101
IV.3.1 Condiciones de la separación cromatográfica.....	101
IV.3.1.1 Columna cromatográfica.....	102
IV.3.1.2 Caudal de gases.....	104
IV.3.1.3 Velocidad del gas portador.....	104
IV.3.1.4 Volumen de inyección de muestra.....	105
IV.3.1.5 Temperatura del inyector.....	105
IV.3.1.6 Temperatura del detector FID.....	106
IV.3.1.7 Elección del disolvente.....	106
<i>IV.4 Estudio del sistema de cinco FAMES sin patrón interno</i>	107
IV.4.1 Separación cromatográfica.....	107
IV.4.2 Validación del método analítico.....	108
<i>IV.5 Estudio del sistema de cinco FAMES con patrón interno</i>	110
IV.5.1 Elección del patrón interno.....	110
IV.5.2 Separación cromatográfica.....	111
IV.5.3 Validación del método analítico.....	112

IV.6 Optimización de las condiciones de la separación cromatográfica de los trece FAMES	114
IV.6.1 Programa de temperatura del horno de la columna.....	115
IV.7 Características analíticas del método cromatográfico optimizado	122
IV.8 Aplicación de la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME) a muestras de biodiesel.....	127
IV.8.1 Aplicación de la extracción en fase sólida (SPE).....	127
IV.8.2 Aplicación de la microextracción en fase sólida (SPME)	129
IV.9 Conclusiones	131
CAPÍTULO V	133
OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE CATÁLISIS HOMOGÉNEA MEDIANTE EL EMPLEO DE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FAMES EN MUESTRAS DE BIODIESEL	
V.1 Antecedentes	137
V.2 Diseño de experimentos.....	142
V.2.1 Optimización secuencial del proceso de obtención del biodiesel.....	143
V.2.1.1 Selección del tipo de catalizador y de alcohol	144
V.2.1.2 Estudio de la influencia del tiempo de reacción	145
V.2.1.3 Estudio de la influencia de la velocidad de agitación.....	146
V.2.1.4 Estudio de la influencia del lavado y del secado del biodiesel.....	147
V.2.2 Optimización del proceso de obtención de biodiesel mediante diseño factorial de experimentos	149
V.2.2.1 Diseño factorial de experimentos de primer orden.....	150
V.2.2.2 Diseño factorial de experimentos de segundo orden	154
V.3 Determinación del contenido de FAMES en muestras de biodiesel.....	164
V.4 Conclusiones	171
CAPÍTULO VI.....	173
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE ACEITE ESTUDIADAS Y DE BIODIESEL OBTENIDAS MEDIANTE CATÁLISIS HOMOGÉNEA A PARTIR DE ELLAS. APLICACIÓN DE LA NORMATIVA UNE-EN 14214:2009	
VI.1 Antecedentes	177
VI.2 Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de aceite utilizadas y de las muestras de biodiesel producidas.....	186
VI.2.1 Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de aceite	187
VI.2.1.1 Densidad	187
VI.2.1.2 Viscosidad cinemática	188
VI.2.1.3 Índice de acidez.....	190
VI.2.1.4 Índice de yodo.....	192
VI.2.1.5 Índice de peróxidos	193
VI.2.1.6 Contenido en agua y materias volátiles	195

VI.2.2 Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea	197
VI.2.2.1 Densidad	198
VI.2.2.2 Viscosidad cinemática	199
VI.2.2.3 Índice de acidez.....	201
VI.2.2.4 Índice de yodo.....	203
VI.2.2.5 Contenido en agua	205
VI.2.2.6 Volatilidad y curva de destilación.....	206
VI.2.2.7 Índice de cetano.....	210
VI.2.2.8 Punto de obstrucción de filtro en frío.....	211
VI.2.2.9 Punto de inflamación o ignición.....	213
VI.2.2.10 Contenido en azufre.....	214
VI.2.2.11 Contenido en cenizas sulfatadas.....	216
VI.2.2.12 Residuo carbonoso Conradson.....	217
VI.2.2.13 Corrosión a la tira de cobre.....	220
VI.2.2.14 Índice de peróxidos y estabilidad a la oxidación	220
VI.3 Conclusiones	224
CAPÍTULO VII	225
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DEL BIODIESEL MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN FAMES POR GC-FID. EMPLEO DE ANTIOXIDANTES	
VII.1 Antecedentes	229
VII.2 Estudio de la influencia del tiempo y la temperatura en la variación del contenido en FAMES del biodiesel.....	232
VII.3 Empleo de antioxidantes para la conservación de las muestras de biodiesel.....	238
VII.4 Conclusiones	248
CAPÍTULO VIII	249
DETERMINACIÓN DE METALES Y SEMIMETALES EN MUESTRAS DE ACEITE Y BIODIESEL MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-AES)	
VIII.1 Antecedentes	253
VIII.1.1 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos en aceites.....	253
VIII.1.2 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos en biodiesel	257
VIII.2 Determinación del contenido de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel aplicando las normas UNE-EN 14107:2003 y UNE-EN 14538:2006	262
VIII.3 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES.....	267
VIII.3.1 Selección de los parámetros instrumentales en ICP-AES	267
VIII.3.2 Estudio de las características analíticas en ICP-AES	270

VIII.4 Desarrollo de un método analítico para la determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel.....	273
VIII.4.1 Optimización del método de digestión en horno de microondas.....	273
VIII.4.2 Validación del método analítico optimizado para la determinación de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel.....	277
VIII.4.3 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel.....	280
VIII.4.3.1 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite.....	280
VIII.4.3.2 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de biodiesel.....	286
VIII.5 Conclusiones.....	292
CAPÍTULO IX.....	295
CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE ACEITE Y BIODIESEL POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON DESORCIÓN/IONIZACIÓN POR LÁSER ASISTIDA POR UNA MATRIZ (MALDI) Y ANÁLISIS POR TIEMPO DE VUELO (TOF)	
IX.1 Antecedentes.....	299
IX.1.1 Aceites vegetales y grasas animales.....	299
IX.1.1.1 Composición.....	299
IX.1.1.2 Aplicación de la espectrometría de masas para el análisis de aceites y grasas.....	300
IX.1.1.3 Aplicación de la técnica MALDI-TOF MS al análisis de aceites.....	303
IX.1.1.4 Biodiesel.....	307
IX.2 Caracterización de las muestras de aceite mediante MALDI-TOF MS.....	308
IX.2.1 Preparación del <i>target</i> y de las muestras de aceite: Optimización.....	308
IX.2.2 Optimización de la matriz.....	312
IX.2.3 <i>Fingerprints</i> o huellas dactilares de las muestras de aceite.....	317
IX.2.3.1 <i>Fingerprints</i> o huellas dactilares de las muestras de aceite de oliva sin usar.....	317
IX.2.3.2 <i>Fingerprints</i> o huellas dactilares de las muestras de aceite de oliva de fritura.....	328
IX.2.3.3 Caracterización del resto de muestras de aceite analizadas.....	341
IX.3 Caracterización de las muestras de biodiesel mediante MALDI-TOF MS.....	350
IX.3.1 Optimización de la matriz.....	350
IX.3.2 <i>Fingerprints</i> o huellas dactilares de las muestras de biodiesel.....	353
IX.4 Estudio de la adulteración de muestras de biodiesel.....	364
IX.5 Conclusiones.....	366
BIBLIOGRAFÍA.....	369

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se desarrolla en el ámbito de las energías renovables, centrándose en los biocombustibles y, en concreto, en el biodiesel. Para su estudio, se ha optimizado el proceso de producción basado en la reacción de transesterificación con catálisis homogénea alcalina, a partir de aceites vegetales, sin usar o procedentes de procesos de fritura, así como diversas metodologías analíticas para determinar su contenido en FAMEs y elementos metálicos y semimetálicos, evaluar sus parámetros de calidad y estabilidad a la oxidación, y caracterizar su composición mediante MALDI-TOF MS, técnica novedosa en este tipo de muestras.

En la primera parte de esta Tesis, se presenta una introducción general sobre el sector de los biocombustibles, su clasificación, y sus ventajas e inconvenientes. Se analiza el pasado, presente y futuro del biodiesel, desde una perspectiva mundial, así como en Europa, España y, en especial, en las Islas Canarias. Además, se detallan aspectos relativos a las principales materias primas empleadas y a los distintos procesos existentes para su producción.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis se muestran y discuten en los Capítulos IV a IX. En el Capítulo IV, se ha desarrollado una nueva metodología analítica para la separación y determinación de trece FAMEs mediante GC-FID. Se han optimizado las variables físicas que afectan al método desarrollado y se han establecido sus parámetros de calidad. La metodología propuesta ha permitido la cuantificación de los trece FAMEs estudiados en muestras de biodiesel, con tiempos de análisis relativamente cortos y buena sensibilidad.

En el Capítulo V, se ha optimizado el proceso de producción de biodiesel, basado en la reacción de transesterificación con catálisis homogénea alcalina, aplicando la metodología del diseño factorial de experimentos y la superficie de respuesta. De esta forma, se han obtenido los valores óptimos para la temperatura de reacción, concentración de catalizador y relación molar metanol-aceite, que permitían obtener el máximo porcentaje de FAMEs en muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceites vegetales sin usar. Asimismo, el método optimizado se aplicó a la producción de biodiesel a partir de aceites de fritura.

La determinación de los parámetros de calidad del biodiesel obtenido, siguiendo el procedimiento optimizado en el capítulo anterior, establecidos en la normativa europea UNE-EN 14214:2009, se muestra en el Capítulo VI. Asimismo, algunos de estos parámetros físico-químicos también se han determinado en las muestras de aceite empleadas como materia prima, con objeto de verificar la mayor o menor necesidad de conversión durante la reacción de transesterificación.

En el Capítulo VII, se ha evaluado la estabilidad a la oxidación del biodiesel con el tiempo, en términos de variación de la composición de FAMES. Para ello, se ha estudiado la variación del porcentaje de FAMES en el biodiesel conservado a temperatura ambiente y a +4 °C, durante seis meses. Por otro lado, se ha estudiado el empleo de varios antioxidantes con objeto de estudiar la conservación del biodiesel, durante tres y seis meses de almacenamiento.

La determinación mediante ICP-AES de 19 elementos metálicos y semimetálicos (aluminio, arsénico, bario, calcio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, fósforo, plomo, vanadio y cinc) en los biodiesel y aceites vegetales empleados como materias primas se recoge en el Capítulo VIII. Para ello, se ha desarrollado un método de digestión ácida en horno de microondas para este tipo de muestras. Por otro lado, la calidad de las muestras de biodiesel y aceite, en cuanto al contenido metálico legislado, se ha evaluado mediante la aplicación de las normas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003.

Finalmente, en el Capítulo IX se ha llevado a cabo la caracterización de las muestras de biodiesel mediante una nueva metodología analítica, basada en el empleo de la técnica MALDI-TOF MS, que no ha sido utilizada previamente de acuerdo con la bibliografía consultada, para verificar el éxito de la reacción de transesterificación de aceites vegetales. Se han registrado y analizado los espectros de masas de las muestras de aceites vegetales utilizadas, tanto sin usar como de fritura, y se han caracterizado los di y triglicéridos presentes en las mismas, así como los posibles productos originados por la degradación térmica de las muestras de aceite de fritura. De la misma forma, se han analizado los espectros de masas de las muestras de biodiesel, comprobándose que la mayoría de ellas no presentaban di y triglicéridos, lo que permite confirmar la transformación de los triglicéridos en FAMES, de forma rápida y sencilla. Esta metodología se ha utilizado también para estudiar la posible adulteración del biodiesel con los aceites vegetales de procedencia.

ACRÓNIMOS



AAI	Autorización ambiental integrada
ANN	Redes neuronales artificiales (<i>Artificial Neural Networks</i>)
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
APPA	Asociación de productores de energías renovables de España
AIE	Agencia Internacional de la Energía (<i>International Energy Agency</i>)
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BioETBE	Bio etil ter-butil éter
BioMTBE	Bio-metil ter-butil éter
CAC	Captación y almacenamiento de carbono
CORES	Corporación de reservas estratégicas de productos petrolíferos
cps	Cuentas por segundo
DHB	2,5-dihidroxibenzoico
DME	Biodimetiléter
EASI-MS	<i>Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry</i>
EBB	<i>European Biodiesel Board</i>
EPA	Agencia de protección medioambiental de EE.UU. (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
FAEEs	Ésteres etílicos de ácidos grasos (<i>Fatty Acid Ethyl Esters</i>)
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos grasos (<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>)
FFA	Ácidos grasos libres (<i>Fatty Acid Free</i>)
FFV	Vehículos de combustible flexible (<i>Flexible Fuel Vehicles</i>)
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
F-AAS	Espectrometría de absorción atómica con llama (<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FTIR	Infrarrojo por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
FTNIR	Infrarrojo cercano por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Near Infrared</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GEI	Gases de efecto invernadero
GF-AAS	Espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito (<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICC	Índice de cetano calculado
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)

IDAE	Instituto para la diversificación y ahorro de la energía del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio de España
ISTAC	Instituto canario de estadística
LD	Límite de detección
LDI	Desorción/ionización por láser (<i>Laser Desorption/Ionization</i>)
LQ	Límite de cuantificación
MALDI	Desorción/ionización por láser asistida por una matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
mbd	Millones de barriles (de petróleo) diarios
MIR	Infrarrojo medio (<i>Mid Infrared</i>)
NIR	Infrarrojo cercano (<i>Near Infrared</i>)
OPEP	Organización de países exportadores de petróleo
PC	Punto de congelación
PCI	Poder calorífico inferior
POFF	Punto de obstrucción de filtro en frío
r	Coefficiente de correlación
RCC	Residuo carbonoso Conradson
RM	Relación molar
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación estándar relativa
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
RP	Fase inversa (<i>Reverse Phase</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid-Phase Extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid-Phase Microextraction</i>)
$S_{y/x}$	Error estándar de la estimación
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TOF MS	Detector de masas de tiempo de vuelo (<i>Time Of Flight Mass Spectrometry</i>)
UE	Unión Europea
WRM	Movimiento mundial por los bosques tropicales (<i>World Rainforest Movement</i>)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los combustibles obtenidos a partir de la naturaleza (biocombustibles) han sido utilizados por los seres humanos desde la antigüedad. Sin embargo, en los últimos años, se ha empezado a explotar su potencial como combustibles alternativos al petróleo, ya que las nuevas tecnologías desarrolladas permiten aprovecharlos eficazmente. El encarecimiento de la energía debido a la escasez de reservas de combustibles fósiles, la dependencia energética de muchos de los países económicamente desarrollados y los graves problemas medioambientales asociados al empleo de estos combustibles, han impulsado el desarrollo de alternativas energéticas, medioambientalmente sostenibles, renovables y económicas, llamadas energías limpias, que serán las sustitutas de los recursos energéticos actuales. El biodiesel obtenido a partir de biomasa se encuentra entre estas energías renovables.

El modelo energético vigente en la actualidad es insostenible, por lo que será necesario un cambio en el estilo de vida de las sociedades para no tener que enfrentarse a una crisis energética de consecuencias todavía impredecibles, fomentando soluciones energéticas que no contaminen, que sean accesibles a todos los países y que sustituyan al soporte energético actual basado en los combustibles fósiles.

I.1 Fuentes de energía y clasificación

La energía ni se crea ni se destruye, sólo se transforma. No obstante, el hecho de que las transformaciones empleadas no sean reversibles, hace que la energía se degrade. Se denomina fuente de energía a los recursos existentes en la naturaleza que el ser humano utiliza para la obtención de energía. Se pueden clasificar como renovables y no renovables, en función de su capacidad de renovación y de que sean recursos limitados o ilimitados.

Las fuentes de energía renovables son aquellas que pueden considerarse como inagotables debido a que recuperan su estado original después de su uso, natural o artificialmente, de forma que ciertos recursos renovables pueden dejar de serlo si su tasa de utilización es tan elevada que su renovación total no es posible. Algunos recursos renovables se pueden considerar perpetuos, ya que su agotamiento no es posible por muy intensiva que sea su utilización. Normalmente, el empleo de una energía renovable implica un impacto medioambiental mucho menor con respecto a la utilización de una energía no renovable. Las energías solar, eólica, mareomotriz, hidráulica y la biomasa son consideradas como fuentes de energía renovables inagotables, ya sea por la inmensa cantidad de energía que contienen o por ser capaces de regenerarse por medios naturales.

Las fuentes de energía no renovables son aquellas que se encuentran en la naturaleza en una cantidad limitada y que acabarán por agotarse en un plazo de tiempo más o menos cercano, ya que la velocidad de su consumo es mayor que la de su regeneración. Una vez consumidas en su totalidad, no pueden reponerse a corto o medio plazo, como en el caso de los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) y las nucleares (fisión y fusión). Muchas de estas fuentes son altamente contaminantes por la elevada toxicidad de los residuos que generan. El hidrógeno necesario como combustible para la fusión nuclear y el propio globo terráqueo como fuente de energía geotérmica se pueden considerar, desde un punto de vista estricto, como energías no renovables, aunque éstas se encuentran en tales cantidades que se podrán emplear durante milenios sin temor a que se agoten, por lo que se les suele dar un tratamiento similar a las renovables.

Ante la tendencia mundial de crecimiento del consumo energético y la dependencia global con respecto a los hidrocarburos como fuente energética, los países desarrollados, así como los emergentes, están prestando una mayor atención a las fuentes de energía renovables como alternativa para reducir dicha dependencia. De esta tendencia surgió el desarrollo de energías renovables tales como la hidráulica, la eólica y la solar, con un mayor grado de implantación y, más recientemente, el aprovechamiento energético de la biomasa, mediante el empleo de biocombustibles. Es necesario que las energías renovables sean fomentadas a través de un marco legal que incluya mecanismos de estímulo a su generación, como primas a la producción, compras obligatorias, comercialización de energía verde, etc. Todas las reformas que no se realicen en este campo en la actualidad supondrán una problemática para las generaciones futuras.

Por otro lado, la situación empeora aún más si se analiza desde el punto de vista medioambiental, debido a los graves problemas de contaminación asociados al empleo de los combustibles fósiles. Entre ellos se encuentra la emisión a la atmósfera de distintos contaminantes, como el dióxido de carbono, uno de los principales gases responsables del efecto invernadero; el monóxido de carbono, que tiene efectos letales sobre la salud humana; los óxidos de nitrógeno e hidrocarburos, causantes de la niebla fotoquímica sobre las grandes ciudades; las emisiones sulfurosas responsables de la denominada lluvia ácida y el material particulado causante de enfermedades respiratorias y algunos tipos de cáncer. Los efectos cada vez más evidentes del calentamiento global, asociados al efecto invernadero, han activado las alarmas y dado lugar a la aparición de leyes proteccionistas para el medio ambiente en la mayoría de los países.

I.2 Tipos de biocombustibles

Los biocombustibles son compuestos químicos como alcoholes, éteres, ésteres, etc., producidos a partir de biomasa, como plantas herbáceas y leñosas, residuos procedentes de la agricultura y actividad forestal, y una gran cantidad de desechos industriales, como los de la industria alimentaria.

Los biocombustibles se pueden clasificar, en función de su estado de agregación, en sólidos, líquidos o gaseosos, siendo el biodiesel y el bioetanol los más importantes y más comúnmente consumidos a nivel mundial.

I.2.1 Biocombustibles sólidos

Son obtenidos directa o indirectamente a partir de la biomasa, por lo que son susceptibles de ser utilizados en aplicaciones energéticas. Están formados por materia orgánica de origen vegetal o animal, en su mayoría celulosa, hemicelulosa y lignina, o producidos a partir de la misma mediante procesos mecánicos, químicos o biológicos. La utilización de estos biocombustibles requiere de una elevada inversión y esfuerzos en I+D para disponer de cultivos energéticos adecuados, crear sistemas de secado, procesos de pirólisis y gasificación de bajo consumo energético y mejorar el control de procesos de combustión y de transformación de la biomasa. Algunos ejemplos de biocombustibles sólidos son restos de poda de vid, olivo y frutales, leña sin procesar, astillas, serrín y triturados finos de menos de 2 mm, *pelets*, briquetas y carbón vegetal, entre otros. Algunas de las materias primas empleadas para la fabricación de biocombustibles sólidos son las cáscaras de frutos secos y huesos de aceituna y otros frutos, los orujillos procedentes de la extracción del aceite de orujo en las almazaras y los restos de las industrias del corcho, la madera y los muebles.

I.2.2 Biocombustibles líquidos

Esta denominación se aplica a una serie de productos, de origen biológico, utilizables como combustibles de sustitución de los derivados del petróleo o como aditivos de éstos para su empleo en los motores de combustión. Actualmente, los biocombustibles líquidos son los más empleados y consumidos a nivel mundial. Se pueden clasificar en:

1. Bioetanol: es un alcohol etílico deshidratado producido a partir de la fermentación de productos de la biomasa ricos en componentes azucarados, amiláceos y, últimamente, lignocelulósicos. Entre los productos agrarios empleados para su producción se encuentran la caña de azúcar, remolacha, maíz, trigo y cebada, así como tallos de maíz y residuos celulósicos. Puede ser empleado como sustitutivo o mezcla para gasolina, incluso en elevados porcentajes de mezcla en los llamados vehículos FFV (*Flexible Fuel Vehicles*). En su producción se obtienen fertilizantes como subproducto.

2. Biodiesel: es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) que se obtiene mediante un proceso de transesterificación, principalmente a partir de aceites vegetales y grasas animales y, más recientemente a partir de algas. Puede emplearse como sustituto del diésel convencional, ya que presenta propiedades similares, reduciendo la contaminación y alargando la vida del motor de los vehículos. En su producción se obtiene glicerina como subproducto, con múltiples aplicaciones a nivel industrial.

3. Biometanol: se obtiene a partir de la biomasa. Puede convertirse en una opción interesante para los vehículos propulsados mediante pilas de combustible (con reprocesado del hidrógeno a bordo) debido a su elevado contenido en hidrógeno.

4. Biodimetiléter (DME): se produce a partir de la biomasa. Es un biocombustible prometedor para motores diésel debido a sus propiedades de combustión y emisión.

5. Aceite vegetal: su utilización sin sufrir ninguna transformación es posible en determinados motores en un porcentaje variable junto con diésel.

6. BioETBE (Etil ter-butil éter): es un aditivo obtenido a partir de la mezcla de bioetanol (47 % en volumen) e isobutileno, empleado en las gasolinas.

7. BioMTBE (Metil ter-butil éter): es similar al BioETBE, obtenido mediante la mezcla del biometanol (36 % en volumen) e isobutanol.

8. Biocarburos sintéticos: son hidrocarburos sintéticos o sus mezclas, producidos a partir del biogás derivado de la biomasa mediante el proceso *Fisher-Tropsch*, construyendo cadenas de polímeros a partir de las moléculas básicas del CO y H₂. A través de este proceso se puede producir un amplio abanico de combustibles de gran calidad.

I.2.3 Biocombustibles gaseosos

Entre los biocombustibles gaseosos que se pueden obtener a partir de la biomasa se encuentran:

1. Gas de gasógeno. Al someter la biomasa a elevadas temperaturas (entre 800 y 1.500 °C) en ausencia de oxígeno, se originan productos gaseosos con un bajo poder calorífico (de 1.000 a 1.200 kcal·m⁻³), consistentes principalmente en N₂, CO, H₂, CH₄ y CO₂ en proporciones variables. Este proceso se realiza en los llamados gasógenos, que se utilizan con fines térmicos, o en combinación con motores, para producir energía mecánica o eléctrica. En principio, el destino del gas de gasógeno suele ser la producción de calor por combustión directa en un quemador o la generación de electricidad por medio de un motor o turbina.

2. El biogás es un combustible gaseoso producido en condiciones anaeróbicas a partir de la biomasa húmeda y/o a partir de la fracción biodegradable de los residuos por descomposición bacteriana, y que se puede purificar hasta alcanzar una calidad similar a la del gas natural, para su empleo como biocombustible o gas de madera. La composición de biogás es variable, pero está formado principalmente por CH₄ (55-65 %) y CO₂ (35-45 %) y, en menor proporción, por N₂ (0-3 %), H₂ (0-1 %), O₂ (0-1 %) y H₂S (trazas). Este tipo de transformación se produce de manera espontánea en pantanos o fondos de lagunas y lagos en los que existan depósitos de materia orgánica. Por este motivo al CH₄ se le ha denominado "gas de los pantanos". También se producen en los vertederos de residuos sólidos urbanos, pudiéndose obtener el gas mediante perforaciones.

3. El biohidrógeno consiste en la separación, mediante diversos procesos biológicos, del oxígeno e hidrógeno del agua. Actualmente, su grado de desarrollo se sitúa en fases iniciales, con rendimientos energéticos muy reducidos, siendo éste el principal reto para su utilización operativa, de forma que permita reducir la dimensión de las instalaciones.

I.3 Evolución histórica de los biocombustibles. Crisis energéticas

La historia de los biocombustibles y la idea de emplearlos como carburantes para los motores de combustión se remonta a finales del siglo XIX. Los considerados como padres de la industria automotriz son Rudolph Diesel y Henry Ford (Mittelbach *et al.*, 2004; Knothe *et al.*, 2005).

La utilización de los biocombustibles líquidos es tan antigua como la de los combustibles fósiles y la de los motores de combustión. Cuando en 1895 Rudolph Diesel diseñó el prototipo del motor de combustión interna, que lleva su nombre, ya estaba previsto que funcionara con aceites vegetales. Durante la presentación del motor diésel en la Exposición Mundial de París, en el año 1900, Diesel empleó aceite de cacahuete (maní) como combustible, o mejor dicho como biocombustible, en lugar de utilizar petróleo, que en esa época era barato, razonablemente eficiente y fácilmente disponible, debido a que en 1886 había entrado en servicio el primer barco especialmente construido para el transporte de

crudo. Todo ello provocó que uno de sus derivados, el gasóleo, se convirtiera rápidamente en el combustible más utilizado en el motor diésel (Pahl, 2005).

Años después Diesel fue muy claro al señalar que *“el motor diésel puede funcionar con aceites vegetales, lo que podría ayudar considerablemente al desarrollo de la agricultura de los países que así lo usen”*. Diesel había concebido a su motor para el uso de aceites vegetales como combustibles y fue quien predijo el futuro empleo de biocombustibles. De hecho, en 1912 dijo: *“El uso de los aceites vegetales como combustibles puede parecer insignificante ahora. Pero estos aceites pueden convertirse con el paso del tiempo en combustibles tan importantes como los productos del petróleo o del carbón son ahora”*.

Por otro lado, cuando Henry Ford realizó el primer diseño de su automóvil en 1908 esperaba utilizar etanol como combustible. De hecho, de 1920 a 1924, la *Standard Oil Company* comercializó un 25 % de etanol en la gasolina vendida en el área de Baltimore, Maryland, EE.UU. Sin embargo, los elevados precios del maíz, junto con las dificultades de almacenamiento y transporte, hicieron abandonar el proyecto. Según se indicó en 1925 en el *New York Times*, Henry Ford predijo que el etanol sería el combustible del futuro: *“Existe combustible en cada partícula de materia vegetal que puede ser fermentable. Existe suficiente alcohol en la cosecha de un año de un acre de patatas como para mover la maquinaria necesaria para cultivar estos campos durante 100 años”*.

A lo largo de la historia, el motor de desarrollo de los biocombustibles han sido las crisis de los recursos petrolíferos, que han incentivado la búsqueda de nuevas fuentes energéticas. Durante el siglo XX se llevaron a cabo varias experiencias sobre la utilización de aceites vegetales como combustible, que no alcanzaron mayor trascendencia.

El mes de octubre de 1973 pasó a la historia por la aparición de una fuerte crisis del petróleo asociada a la cuarta guerra árabe-israelí. La negativa de la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) de exportar crudo a los países que habían apoyado a Israel durante la guerra del Yom Kippur (EE.UU. y sus aliados de Europa Occidental) fue una de sus principales causas. Durante ese mes, el precio de la gasolina, que se había mantenido prácticamente constante durante los últimos cinco años en los países industrializados, se incrementó al doble del precio que había mantenido durante los meses anteriores. El mundo desarrollado se resintió y los sectores más radicales comenzaron a justificar la idea de un posible ataque militar hacia los países árabes para defender sus intereses. La escasez de petróleo hizo peligrar el suministro y este hecho provocó la búsqueda de combustibles alternativos a los derivados del petróleo, por lo que, a raíz de la primera crisis del petróleo, los biocombustibles comenzaron a desarrollarse de forma significativa. En la Figura I.1 se muestra la evolución histórica del precio del barril de petróleo Brent de 1860 a 2008.

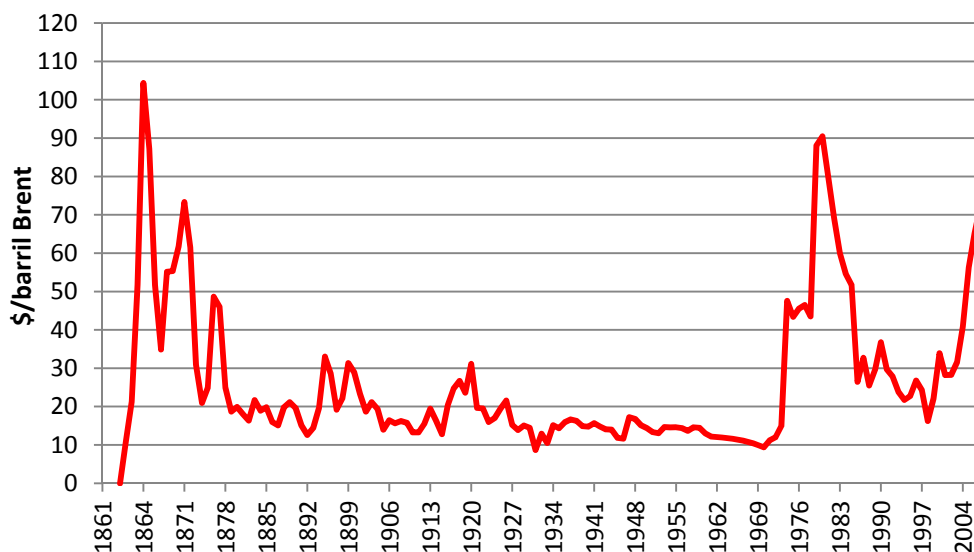


Figura I.1.- Evolución del precio del petróleo, en dólares, durante el periodo 1860-2008.

Fuente: *Statistical Review of World Energy 2009*. BP.

En 1975, con el lanzamiento en Brasil del Programa Nacional de Alcohol (PROALCOHOL), se puso en marcha el que se considera el primer y mayor programa de energías renovables a gran escala hasta la fecha, cuyo objetivo era la de estimular la sustitución total de los combustibles fósiles por alcohol y, en consecuencia, reducir la dependencia del país frente a la utilización de petróleo. La alternativa propuesta era el bioetanol, obtenido a partir de la caña de azúcar. A finales de 1979, a raíz de la preocupación generada por la primera crisis del petróleo, una mezcla de gasolina y etanol se comercializó en EE.UU. Los combustibles alternativos se convirtieron así en la solución al problema que representaba el agotamiento de los recursos no renovables. De esta forma, la *American Oil Company* y otras empresas abanderadas en el sector comenzaron a comercializar etanol para diluir la gasolina y aumentar así el octanaje de la misma.

A comienzos de la década de los ochenta, la aparición de una segunda crisis del petróleo relacionada con el inicio de la guerra irano-iraquí, provocó una nueva caída en el consumo de petróleo. El conflicto produjo la congelación de las exportaciones de crudo iraní y una subida desorbitada de los precios. En esta ocasión, las medidas paliativas no se hicieron esperar y las grandes potencias mundiales pusieron en marcha de inmediato restricciones al consumo. No obstante, el aumento de la producción de crudo por parte de Arabia Saudí y la posterior reanudación de las exportaciones de Irán, provocaron el abaratamiento del precio del petróleo. Estos hechos promovieron el abandono de las estrategias de fomento de los biocombustibles iniciadas unos años antes con motivo de la primera crisis del petróleo.

Las primeras pruebas técnicas con biodiesel se realizaron en Austria y Alemania en 1982, y fue en 1985 cuando en Silberberg (Austria) se construyó la primera planta piloto de producción de biodiesel a partir de semillas de colza. Actualmente, países como Alemania,

Francia, Austria, Estados Unidos, Canadá, Suecia y Brasil son pioneros en el desarrollo, producción y utilización de biodiesel como biocombustible para automóviles.

La década de los noventa comenzó con una nueva crisis del petróleo, esta vez derivada de la invasión de Kuwait por Irak. Nuevamente, el petróleo se encareció y los biocombustibles volvieron a la escena energética y política de la mayoría de los países.

A raíz de la destrucción del *World Trade Center* de Nueva York, el 11 de septiembre de 2001 por un atentado de la organización terrorista *Al Qaeda* y de los conflictos generados a partir de este suceso, comenzó de nuevo la pugna por los recursos petrolíferos y el precio del crudo se inestabilizó. El terrorismo y la opresión sobre las clases más desfavorecidas están relacionados con la localización de los combustibles fósiles en determinados países y la fuerte dependencia económica que tiene la humanidad de éstos. Potenciando la producción y consumo de biocombustibles se contribuye a redistribuir la riqueza y a minimizar la dependencia de los combustibles fósiles. La necesidad de encontrar alternativas energéticas se debe, fundamentalmente, al agotamiento de los recursos fósiles, al incremento de las emisiones de contaminantes, que se sitúan por encima de la capacidad de regeneración de los ecosistemas, y a que las dos terceras partes de las reservas petrolíferas están en la región del golfo Pérsico.

Posteriormente, en el año 2008, el comienzo de la actual crisis económica mundial provocó un aumento considerable del precio del barril de petróleo. A diferencia de las anteriores crisis del petróleo, ésta no fue originada por un enfrentamiento bélico entre los grandes países productores de petróleo. Las principales causas de esta crisis estaban en los elevados precios de las materias primas, la sobrevalorización de los productos, una crisis alimentaria mundial y energética, una elevada inflación planetaria y la amenaza de una recesión mundial, así como una crisis crediticia, hipotecaria y de confianza en los mercados. Ese año el barril de crudo superó los 100 dólares por primera vez en la historia y llegó a costar 147 dólares el 11 de julio de 2008, aunque en 2009 bajó hasta los 40 dólares.

Durante el presente año 2011, las tensiones en los países árabes se han traducido no sólo en pérdidas materiales y humanas, sino también en una amenaza para el crecimiento de la economía mundial. La tensión en Túnez, Egipto, Libia y Siria ha disparado los precios del petróleo y de la gasolina a niveles históricos. El mercado ve con preocupación si el efecto dominó sigue su curso a Argelia, Bahrein, Arabia Saudí, Yemen e Irán, que junto con Libia, generan alrededor del 30 % de la demanda mundial de petróleo. Durante esta nueva crisis, el barril de crudo Brent está rozando la barrera de los 130 dólares (mayo 2011), un nivel no alcanzado desde agosto de 2008, como consecuencia de lo ocurrido en Libia. En la Figura 1.2 se muestran los principales países exportadores de petróleo a España durante el año 2010. Se observa que, aproximadamente, el 64 % del petróleo que importa nuestro país procede de países del continente africano, por lo que la dependencia española y el precio de los combustibles comercializados en España está en manos de la situación política de estos países.

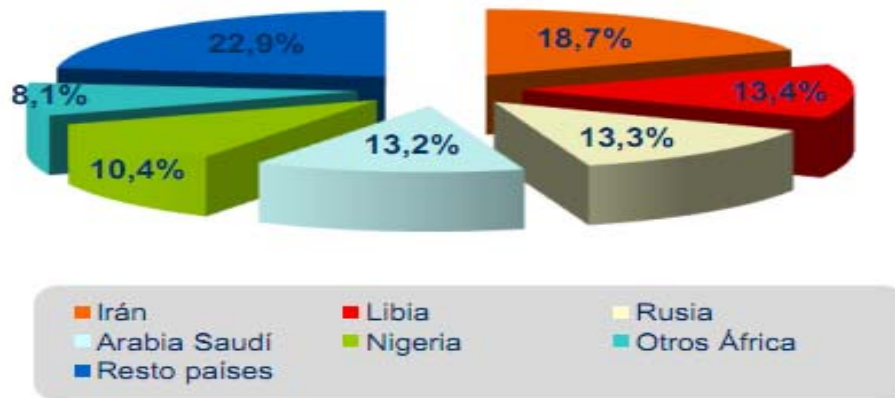


Figura I.2.- Principales países exportadores de petróleo a España durante el año 2010.

Fuente: Boletín estadístico de CORES (Diciembre de 2010).

En la Figura I.3 se muestra la evolución actual del precio del barril de petróleo desde 1991 hasta mayo de 2011, donde se observa principalmente la crisis económica del 2008 y la actual crisis de los países árabes, de la que España no puede permanecer indiferente.

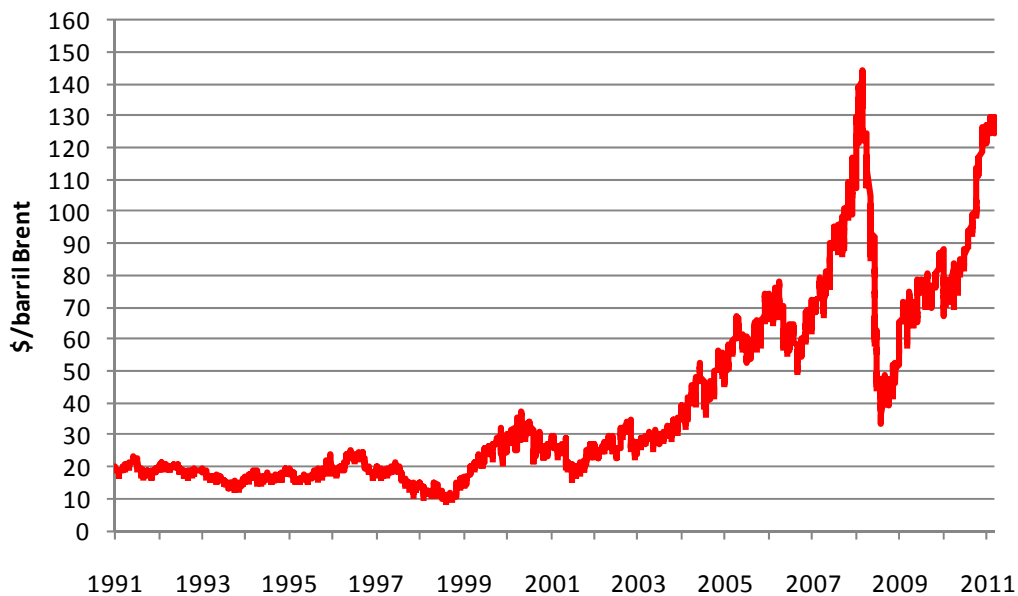


Figura I.3.- Evolución del precio del petróleo, en dólares, desde 1991 hasta mayo de 2011.

Fuente: <http://www.24hgold.com>.

En 1956, el geólogo norteamericano M.K. Hubbert analizó la evolución de la producción de petróleo en EE.UU., calculando con bastante exactitud el momento en que ésta alcanzaría su máximo. Ese momento se conoce como pico de Hubbert o cenit del petróleo. El tramo de bajada de la curva de Hubbert está caracterizado por una extracción más lenta, más costosa energéticamente y más compleja tecnológicamente. Extrapolando los cálculos a nivel mundial, los geólogos Campbell y Laherrère afirmaron en 1998 que alrededor del año 2010 se alcanzaría el *Peak Oil* global. La teoría del pico de Hubbert es una teoría influyente acerca de la tasa de agotamiento a largo plazo del petróleo, así como de otros combustibles fósiles. Predice que la producción mundial de petróleo llegará a su cenit y después disminuirá tan rápido como creció, resaltando el hecho de que el factor limitante de la extracción de petróleo es la energía requerida y no su coste económico. En la Figura I.4 se muestra la curva de producción de

petróleo, en la que se observa el decaimiento previsto en la producción de petróleo a nivel mundial, a mayor velocidad de como se produjo el aumento de la misma, básicamente debido al incremento de la población mundial (se prevé alrededor de 8.000 millones de habitantes para el año 2030), por lo que se aumentará el consumo de combustibles fósiles.

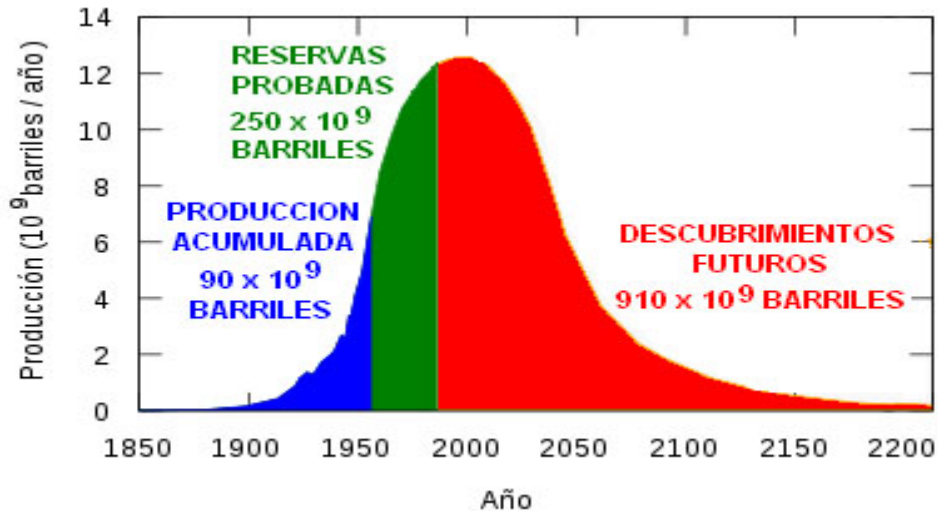


Figura I.4.- Teoría del pico de Hubbert o del punto de inflexión.
(Fuente: *International Energy Agency*).

Según informes a largo plazo de la Agencia Internacional de la Energía (AIE), la demanda de petróleo crecerá un 1,9 % anualmente de aquí al año 2030, pasando de los 84 millones de barriles diarios (mbd) a los 116 mbd. Sin embargo, en su último informe a medio plazo sobre el mercado del petróleo, la misma agencia ha expresado su preocupación por las dificultades que entrañará satisfacer la demanda de petróleo ya en 2012. Las razones que esgrime la AIE son la disminución de la capacidad de producción excedentaria, el declive de la producción de petróleo fuera de la OPEP, y los llamados “factores de superficie”, como los retrasos en la exploración y producción, la falta de profesionales, la concentración de las reservas de petróleo en zonas política y meteorológicamente inestables y la insuficiente aportación de líquidos sustitutivos del petróleo, como los biocombustibles o los petróleos no convencionales (petróleos que no se encuentran en forma suficientemente líquida o que requieren de transformaciones adicionales antes de poder ser refinados en otros productos).

Por lo tanto, los biocombustibles se han transformado hoy en día en una importante fuente natural de energía alternativa. Debido a la enorme volatilidad del precio del petróleo, al eventual agotamiento de los combustibles fósiles y al calentamiento global, los biocombustibles son cada vez más empleados a nivel mundial.

I.4 Biocombustibles: definición y clasificación

La Real Academia de la Lengua Española define la palabra “biocombustible” como un combustible obtenido mediante el tratamiento físico o químico de materia vegetal o de residuos orgánicos. Según esta definición, incluso el petróleo se podría considerar como un biocombustible porque procede de restos fósiles de seres que vivieron hace millones de años.

En la actualidad, se tiende a definir como biocombustible a un carburante de origen biológico obtenido de manera renovable a partir de restos orgánicos o de semillas oleaginosas.

La *American Society for Testing and Materials* (ASTM) define al biodiesel como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables, tales como aceites vegetales o grasas animales, y que se emplean en motores de ignición de compresión (motores diésel) o en las calderas de calefacción. Esta definición incluye además de los ésteres metílicos o etílicos, otros ésteres de monoalcoholes como iso-propílicos y butílicos, entre otros.

El biodiesel puro no es tóxico para las plantas, animales y seres humanos. Se produce a partir de aceites vegetales obtenidos a partir de diferentes tipos de semillas oleaginosas (Bernardo *et al.*, 2003; Demirbas, 2003; Abreu *et al.*, 2004; Azcan *et al.*, 2007, 2008; Akoh *et al.*, 2007; Tiwari *et al.*, 2007; Berchmans *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010), de grasas animales (Goodrum *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Saraf *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Baquero *et al.*, 2010), de algas con un elevado contenido oleaginoso (Molina Grima *et al.*, 1999, 2001, 2003; Miao *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Demirbas *et al.*, 2011; García Camacho *et al.*, 2011) e incluso a partir de aceites procedentes de procesos de fritura (Dorado *et al.*, 2003a, 2003b; Cetinkaya *et al.*, 2004; Encinar *et al.*, 2005, 2007; Felizardo *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006a, 2010; Georgogianni *et al.*, 2007; Utlu *et al.*, 2007, 2008; Wang *et al.*, 2007; Issariyakul *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2008), lo que permite la eliminación de un residuo muy contaminante para los acuíferos.

Los biocombustibles, de acuerdo con el tipo de materia prima que se utiliza para elaborarlos, pueden clasificarse en de primera, segunda, tercera o cuarta generación.

- Los biocombustibles de primera generación fueron los primeros en fabricarse y son los que despiertan una mayor preocupación, ya que utilizan como materia prima cultivos alimentarios o forrajeros tradicionales. Las materias primas empleadas para la producción de biodiesel de primera generación son obtenidas, principalmente, a partir de semillas oleaginosas comestibles, como la soja, colza, girasol y palma (Mittelbach *et al.*, 2004; Knothe *et al.*, 2005; Canakci *et al.*, 2008; Sumathi *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008; Moser, 2009; Pinzi *et al.*, 2009; Atadashi *et al.*, 2010; Celikten *et al.*, 2010; Rattanaphra *et al.*, 2010). Además de estas semillas oleaginosas, existen otras plantas que producen aceites comestibles con las que se pueden elaborar biocombustibles, como son los aceites de coco (Karmakar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010a), cacahuete, algodón (Georgogianni *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2009), mostaza (Demirbas, 2009), oliva (Dorado *et al.*, 2003a, 2003b), etc. Este tipo de biocombustible es viable a corto plazo ya que es limitado el uso de las tierras agrícolas para cultivos que luego se empleen en fabricar biocombustibles sin que se genere inseguridad alimentaria o incrementos de los precios de los alimentos de consumo para los sectores más desfavorecidos de la población. Además, es necesario tener en cuenta los problemas medioambientales, como

agotamiento del suelo, deforestación, uso extensivo de la tierra, etc. Es importante aprovechar los beneficios de la bioenergía sin crear nuevos problemas sociales y ambientales.

- Los biocombustibles de segunda generación son los obtenidos a partir de especies vegetales oleaginosas que no entran en competencia directa con el mercado alimentario, empleando como materias primas productos que no están destinados a la alimentación y cultivados en terrenos no agrícolas o marginales. Por lo tanto, se emplean semillas oleaginosas no comestibles, residuos vegetales y animales y aceites o grasas usados, procedentes de procesos de fritura que son desechos de la industria alimentaria y del sector servicios. Incluso es posible el empleo de residuos orgánicos urbanos. Mediante procesos termoquímicos basados en la gasificación de la biomasa lignocelulósica se puede obtener gas de síntesis, que constituye la materia prima para la producción de diferentes biocombustibles líquidos como el biodiesel sintético o *Fischer-Tropsch* o el biometanol, entre otros, que son considerados como biocombustibles de segunda generación.

El principal problema que presentan las semillas oleaginosas no comestibles es su elevado precio, ya que el costo de la producción del aceite representa un 75-85 % del coste final del biodiesel. La búsqueda de nuevas materias primas que no compitan con el mercado de la alimentación, tanto humana como animal, es un tema que despierta gran interés en la comunidad científica. Además, una semilla oleaginosa alternativa ideal para la elaboración de biodiesel debe caracterizarse por presentar una gran adaptabilidad climática a la región donde se cultiva (lluvias o sequías, tipo de suelo, latitud, etc.), disponibilidad regional, alto contenido de aceite, bajo contenido en ácidos grasos libres (FFA), compatibilidad con la estructura existente en el campo, bajas necesidades agrícolas (fertilizantes, agua, pesticidas), crecimiento definido por temporada, maduración uniforme de su cosecha, mercado potencial para los subproductos y disponibilidad de crecimiento en tierras no aptas para la agricultura tradicional o en campos de cultivo que se utilizan fuera de temporada de las plantaciones habituales (Moser, 2009).

Una gran variedad de semillas oleaginosas no comestibles se han estudiado con objeto de encontrar una alternativa económicamente viable, capaz de competir con los actuales precios del petróleo y que, además, sea una solución sostenible que cumpla con una serie de consideraciones técnicas, éticas, económicas y sociales para la producción de biodiesel (Leung *et al.*, 2010, Balat, 2011). Por ejemplo, la *Jatropha curcas* produce una semilla oleaginosa a partir de la cual se obtiene un aceite que no tiene uso alimentario al ser altamente tóxica y presenta exigencias reducidas en cuanto a fertilización, calidad del suelo y agua, en relación con los cultivos de primera generación (Pramanik, 2003; Lu *et al.*, 2009; Pinzi *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2010; Ying Koh *et al.*, 2011). Otras semillas de este tipo son: *Pongamia pinnata* (Meher *et al.*, 2006a; Naik *et al.*, 2008; Mukta *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011), *Ricinus communis* (Da Silva *et al.*, 2006; Hincapié *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2010), *Maclura pomifera* (Saloua *et al.*, 2010), *Arachis hipogea* L. (Kaya *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2010), *Cynara cardunculus* (Pinzi *et al.*, 2009; Gominho *et al.*, 2011), *Eruca sativa* gars (Li *et al.*, 2009; Chakrabarti *et al.*, 2010),

Madhuca indica (Puhan *et al.*, 2005; Ghadge *et al.*, 2006), *Azadirachta indica* (SathyaSelvabala *et al.*, 2010), *Hibiscus sabdariffa* L. (Nakpong *et al.*, 2010), *Hibiscus esculentus* (Anwar *et al.*, 2010), *Calophyllum inophyllum* L. (Venkanna *et al.*, 2009; SathyaSelvabala *et al.*, 2011), *Hevea brasiliensis* (Ikwaagwu *et al.*, 2000; Melvin Jose *et al.*, 2011), *Brassica carinata* (Bouaid *et al.*, 2009), *Camelina sativa* (Fröhlich *et al.*, 2005; Moser *et al.*, 2010), *Asclepias syriaca* (Holser *et al.*, 2006), *Terminalia belerica* Robx. (Chakraborty *et al.*, 2009), *Moringa oleifera* (Da Silva *et al.*, 2010), *Nicotiana tabacum* (Veljković *et al.*, 2006; Pirola *et al.*, 2010), *Zanthoxylum bungeanum* (Zhang *et al.*, 2008), *Balanites aegyptiaca* (Chapagain *et al.*, 2009a), *Terminalia catappa* L. (Dos Santos *et al.*, 2008), *Sesamun indicum* L. (Saydut *et al.*, 2008), *Cucurbita pepo* (Mittelbach *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2010).

- Los biocombustibles de tercera generación son los obtenidos a partir de microalgas, que son organismos unicelulares fotosintéticos, procariotas o eucariotas, que presentan un elevado contenido de lípidos que permiten obtener un tipo de aceite vegetal a partir del cual se puede producir biodiesel. El cultivo de microalgas se puede hacer en sistemas abiertos, tales como lagos o estanques, y en sistemas cerrados llamados fotobiorreactores. Pueden crecer en medios acuosos, pero necesitan menos agua que los cultivos terrestres, por lo que reducen la carga sobre las fuentes de agua dulce. También pueden cultivarse en agua salada por lo que no provocan el cambio del uso del suelo, reduciendo al mínimo los impactos ambientales asociados, si bien no comprometen la producción de alimentos y otros productos derivados de los cultivos. A gran escala, las microalgas necesitan condiciones cuidadosamente controladas y un ambiente natural óptimo, con el reto de reducir el costo por unidad de área.

Las microalgas son capaces de reproducirse durante todo el año por lo que la productividad del aceite obtenido a partir de ellas supera el rendimiento de los mejores cultivos de semillas oleaginosas. A partir de microalgas, se obtiene una cantidad de aceite correspondiente al 30-50 % del peso seco de la biomasa inicial. Las microalgas son fuentes ideales para la producción de biodiesel debido a la gran capacidad que presentan para aumentar su tamaño poblacional. Su elevada velocidad de crecimiento permite duplicar su biomasa en periodos de tiempos de 3,5 h (Christi, 2007). Su fuente de alimentación es el CO₂, reduciendo los niveles de este gas en la atmósfera, que es uno de los principales gases de efecto invernadero (GEI) (el cultivo de 1 kg de microalgas consume alrededor de 1,8 kg de CO₂). Los nutrientes para el cultivo de microalgas (N₂ y P) pueden obtenerse a partir de aguas residuales, por lo que los efluentes orgánicos de la industria agroalimentaria pueden proporcionar un adecuado medio de crecimiento. El cultivo de microalgas origina subproductos muy valiosos como biopolímeros, proteínas o carbohidratos, y los residuos obtenidos después de la extracción del aceite se utilizan como fertilizantes en los campos de cultivo tradicionales al no emplearse herbicidas o pesticidas (Rodolfi *et al.*, 2009).

Las actuales limitaciones para extender la utilización de esta materia prima tienen que ver con la optimización de la recolección y de los procesos de extracción para mejorar la eficiencia de la producción de microalgas. Asimismo, otros parámetros que necesitan ser

ajustados cuidadosamente son la luz, nutrientes, temperatura, turbulencias, niveles de CO₂ y O₂, con objeto de obtener condiciones óptimas para conseguir los mejores rendimientos en cuanto al contenido de aceite (Mata *et al.*, 2010). La biodiversidad de las microalgas es enorme: se han identificado alrededor de 40.000 especies, aunque se estima que existen más de 100.000, de las que se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Algunos ejemplos de microalgas son la familia de las *bacillariophyceae*, *chlorophyceae*, *chrysophyceae* y cianobacterias (Ahmad *et al.*, 2011).

- Los biocombustibles de cuarta generación llevan los de tercera generación un paso más allá. La clave es la captación y almacenamiento de carbono (CAC), tanto a nivel de la materia prima como de la tecnología del proceso. La materia prima no sólo se adapta para mejorar la eficiencia del proceso, sino que se diseña para captar más CO₂ a medida que el cultivo crece. Los procesos (principalmente termoquímicos) también se combinan con tecnologías de captación y almacenamiento de carbono, que encauzan el CO₂ generado en las formaciones geológicas (por ejemplo, yacimientos petrolíferos agotados) o a través del almacenamiento en minerales (en forma de carbonatos). De esta manera, se cree que los biocombustibles de cuarta generación contribuyen más a la reducción de las emisiones de GEI, porque son más neutros o incluso negativos en carbono si se comparan con los biocombustibles de las otras generaciones.

I.5 Biodiesel: ventajas e inconvenientes

La producción y utilización del biodiesel como combustible alternativo al diésel de petróleo presenta una serie de ventajas, así como también algunos inconvenientes.

I.5.1 Ventajas

Se distinguen principalmente tres tipos de ventajas para el uso y la producción de biodiesel: medioambientales, técnicas y socioeconómicas.

I.5.1.1 Ventajas medioambientales

El biodiesel es un combustible renovable, al obtenerse a partir de la biomasa, por lo que no existe riesgo de agotarse por su empleo como sí ocurre con los combustibles fósiles. Además, si la materia prima empleada es aceite de fritura, se elimina un residuo altamente contaminante de las aguas, el cual es difícil de tratar en las depuradoras. Por otro lado, el biodiesel es biodegradable, ya que está formado por cadenas hidrocarbonadas, lo que lo hace biológicamente activo, a diferencia del diésel convencional, que no lo es al estar formado por una mezcla de alcanos lineales y ramificados, alquenos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos que son difíciles de degradar. Zhang *et al.* (1998) mostraron que el biodiesel derivado del aceite de colza y de soja posee una biodegradabilidad de 88,5% en 28 días, indicando que el biodiesel presenta una mayor degradación que el diésel convencional en ambientes acuosos. Según estos autores, en presencia de mezclas diésel-biodiesel los

microorganismos pueden utilizar los ácidos grasos del biodiesel como fuente de energía para promover la degradación del combustible diésel. Sin embargo, Cerveró *et al.* (2008) indicaron que el biodiesel se degrada en medios acuosos en un 95 % a los 28 días, mientras que, en el mismo periodo de tiempo, sólo el 40 % del diésel sufrió la degradación microbiana, puesto que los microorganismos pueden degradar más fácilmente los alquenos que los compuestos aromáticos presentes en el diésel. Por lo tanto, el biodiesel se degrada de 4 a 5 veces más rápido que los combustibles de origen fósil, por lo que un vertido de biodiesel se podría eliminar en un periodo de, aproximadamente, 28 días (Pasqualino *et al.*, 2006).

Los beneficios medioambientales asociados al consumo de bioetanol y biodiesel son principalmente la reducción de las emisiones de GEI, la disminución de la contaminación atmosférica y la mejora de la eficiencia energética (APPA Biocarburantes, 2008).

El biodiesel disminuye las principales emisiones contaminantes de los vehículos con motores diésel, como son el CO, los hidrocarburos volátiles, los metales pesados y el material particulado, al tratarse de un combustible 100 % vegetal. Asimismo, supone un ahorro de, aproximadamente, un 80 % de las emisiones de CO₂ producidas por los combustibles derivados del petróleo, disminuyendo notablemente la emisión de los GEI producidos por el transporte. Además, prácticamente no contiene azufre, por lo que no genera SO₂, un gas que contribuye en forma significativa a la lluvia ácida. Por lo tanto, en comparación con los combustibles tradicionales, la combustión de biodiesel genera menos elementos nocivos para el medio ambiente (Demirbas, 2003; Koh *et al.*, 2008).

Por otro lado, no contiene ni benceno ni otras sustancias aromáticas cancerígenas (hidrocarburos poliaromáticos, hidrocarburos no poliaromáticos u olefinas e hidrocarburos oxigenados), a diferencia de los combustibles fósiles que presentan concentraciones de estos compuestos que son perjudiciales para la salud. La ausencia de estas sustancias contaminantes en las emisiones disminuye el riesgo de enfermedades respiratorias y alergias.

Las emisiones de la mayoría de los principales contaminantes son netamente inferiores en comparación con el gasóleo de origen fósil, lo que ayudaría a mitigar el efecto invernadero. El biodiesel hace innecesaria una cantidad equivalente de diésel, cuya extracción y refino generan graves daños al medio ambiente, incluso antes de haberse quemado en un motor de combustión. Para su comercialización, normalmente el biodiesel se mezcla con diésel hasta un 20 % como máximo (B20), aunque en la actualidad se llega a comercializar puro, sin mezclas, lo que le proporciona una mayor lubricidad a los motores. En la Figura 1.5 se muestran las emisiones generadas mediante la combustión del biodiesel, según la Agencia de Protección Medioambiental de EE.UU. (EPA).

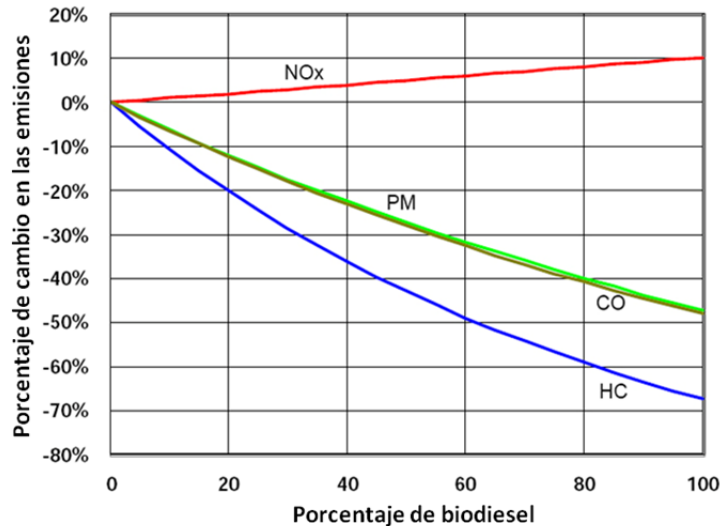


Figura I.5.- Principales emisiones originadas por la combustión del biodiesel
(Fuente: *Environmental Protection Agency*, 2002).

En esta gráfica se puede observar que las emisiones de monóxido de carbono (CO), hidrocarburos no quemados (HC) y material particulado (PM) disminuyen, mientras que la emisión de óxidos de nitrógeno (NO_x) aumenta ligeramente. Para el B20 y el biodiesel puro, las emisiones de HC, CO y PM disminuyen entre un 20 y un 67 %, un 12 y un 50 %, y un 12 y un 48 %, respectivamente.

La materia prima del biodiesel ha mostrado influencia en las emisiones de NO_x debido al mayor contenido en O₂ presente en la misma. De forma general, la emisión de este contaminante es mayor cuanto mayor es el grado de insaturación del biodiesel o menor es la longitud de cadena del mismo (Castro *et al.*, 2007). Sin embargo, existe una gran controversia entre los diferentes autores consultados en cuanto a la emisión de este contaminante. La mayoría de ellos encontraron un ligero incremento en la emisión de NO_x (10-15 %) al emplear biodiesel (Agarwal *et al.*, 2001; Monyem *et al.*, 2001; Cardone *et al.*, 2002; Yamane *et al.*, 2004), si bien también es posible encontrar algunos autores que no encontraron diferencias significativas (Durbin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000) o que determinaron incluso pequeñas disminuciones en las emisiones de NO_x al emplear biodiesel (Ballesteros, 2002; Lapuerta *et al.*, 2002, 2005; Dorado *et al.*, 2003a; Sahoo *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, el adelanto de la inyección, el mayor número de cetano del biodiesel y la mayor presencia de oxígeno procedente de la materia prima han sido tratados en la bibliografía para justificar el ligero incremento de NO_x con el empleo del biodiesel. El incremento del índice de cetano disminuye el tiempo de retraso y adelanta así el inicio de la combustión en el motor, por lo que su efecto puede ser igual que el del adelanto de la inyección. La otra razón por la que se pueden incrementar las emisiones de este contaminante se basa en la mayor disponibilidad de O₂ en la cámara de combustión para combinarse con el N₂ del aire y formar NO_x (Schmidt *et al.*, 1996; Monyem *et al.*, 2001).

En general, dos son las medidas que más han sido comentadas en la bibliografía consultada para eliminar el incremento de NO_x al sustituir diésel por biodiésel. La primera de ellas consiste en una modificación de la inyección que, como ya se ha discutido, es la causa más probable del incremento de NO_x . La segunda medida es la utilización de biodiésel más saturado. Leung *et al.* (2006) propusieron variaciones de diversa naturaleza en la inyección para optimizar las emisiones de estos gases con el biodiésel. Estos autores encontraron mayores emisiones de NO_x , pero demostraron que estableciendo convenientemente la presión y el adelanto de inyección, así como las dimensiones de los componentes de la bomba de inyección, se reducen las emisiones de NO_x del biodiésel con respecto al diésel, sin aumentar las emisiones de partículas e hidrocarburos.

Por otra parte, otros autores han propuesto la utilización de biodiésel con mayor grado de saturación para disminuir la emisión de NO_x . Chapman *et al.* (2004) estudiaron dos posibilidades para reducir la emisión de NO_x de mezclas de biodiésel con diésel. Por un lado, aumentaron la saturación del biodiésel mezclando 85 % de biodiésel de soja y 15 % de un aditivo a base de ésteres saturados formado por 60 % de éster metílico caprílico (C8:0) y 40 % de éster metílico cáprico (C10:0). Los autores eligieron ésteres saturados de cadena corta para compensar el deterioro de las propiedades de flujo en frío con la saturación, con la esperable mejora debida a la menor longitud de cadena. Probaron este nuevo biodiésel mezclado al 20 % con diésel convencional y observaron una disminución en la emisión de NO_x del 2,8 % respecto de la misma mezcla al 20 % de biodiésel sin diésel.

Otro atractivo del biodiésel desde el punto de vista medioambiental es que su producción supone una alternativa de uso de aquellas tierras agrícolas que, por razones de mercado, están siendo abandonadas por los agricultores, evitando así los fenómenos de erosión y desertificación. La materia prima con la que se produce el biodiésel son vegetales que, en su crecimiento, fijan en forma de carbono una parte del CO_2 que se encuentra en la atmósfera, de manera que se recicla casi todo el carbono involucrado desde el crecimiento del grano hasta su combustión en el motor, lo que favorece el cumplimiento de compromisos internacionales ya adquiridos, como el Protocolo de Kioto. En la Figura 1.6 se muestra un esquema del Ciclo del Carbono para el biodiésel.



Figura 1.6.- Esquema del Ciclo del Carbono del biodiésel.

Se puede considerar que el CO₂ que emite el biodiesel a la atmósfera durante el proceso de combustión entra a formar parte del ciclo cerrado del carbono de la biosfera, con lo que se consigue que el balance neto de CO₂ sea muy bajo. La combustión de una tonelada de diésel emite, aproximadamente, tres toneladas de CO₂ que llega a ser prácticamente lo mismo que la combustión de una tonelada de biodiesel. Sin embargo, debido a que el biodiesel recicla CO₂, la sustitución del diésel de petróleo por biodiesel reduciría la emisión neta de CO₂. Por tanto, se puede decir que el uso de biodiesel tiene un impacto directo y muy positivo en la reducción de la cantidad de CO₂ emitida por los motores de combustión, ya que es el mismo que captó la planta oleaginosa durante su etapa de crecimiento mediante la fotosíntesis.

1.5.1.2 Ventajas técnicas

La incorporación del biodiesel al sistema de almacenamiento, distribución y venta es sencilla, posibilitando el empleo de la infraestructura actual de las gasolineras. Por otro lado, y a diferencia de lo que ocurre con otros combustibles alternativos como el H₂, el biodiesel adquiere más importancia aún, debido a la facilidad que supondría introducirlo en el mercado, puesto que sus características son muy similares a las del diésel convencional que se emplea actualmente en automoción. Esto implica que no es necesario introducir cambios significativos en la actual logística de distribución y venta utilizada para el gasóleo.

El empleo del biodiesel puede aumentar la vida útil de los motores de los vehículos, al evitar el desgaste de todo el sistema de inyección de combustible, y su utilización no requiere modificación alguna en los motores actuales, ya que, desde los años 90, la mayoría de los fabricantes de automóviles han reemplazado las gomas y cauchos para la fabricación de tubos y juntas por otros plásticos y polímeros que el biodiesel no es capaz de disolver. Además, la renovación de las instalaciones de distribución de combustibles no es necesaria, con el consiguiente ahorro en inversiones para la utilización de este biocombustible considerado ecológico con el medio ambiente. Asimismo, posee mejores cualidades lubricantes que los combustibles obtenidos a partir del petróleo (Knothe *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, es el único combustible alternativo que funciona en cualquier proporción con el combustible diésel de petróleo, desde el B10 hasta el B100. Además, el punto de inflamación (temperatura mínima a la cual un combustible líquido, por evaporación, puede formar mezclas explosivas con el aire) del biodiesel es el doble del diésel convencional. Esta ventaja es de vital importancia debido a los requerimientos legales en lo que se refiere a la seguridad en el manejo, transporte y almacenamiento del biocombustible. Otra de las ventajas es que, por regla general, presenta un mayor índice de cetano que el diésel, lo que se traduce en una mayor eficiencia en el motor.

I.5.1.3 Ventajas socioeconómicas

La producción de biodiesel constituye una alternativa para aquellas tierras agrícolas en desuso, promoviendo la economía rural y manteniendo el empleo en el sector agrícola. Además del desarrollo económico del medio rural, mejora el autoabastecimiento de combustible y reduce la dependencia del petróleo. La disponibilidad de combustibles es clave para mover la maquinaria utilizada en las labores agrícolas. En este sentido, la posibilidad de que los productores rurales puedan autoabastecerse del combustible necesario redundará de manera positiva tanto en la autonomía como en la economía de dichos medios. De esta forma, se fijaría la población en el ámbito rural en países no europeos, manteniendo los niveles de trabajo y renta, y fomentando la creación de diferentes industrias.

Por otra parte, el uso del biodiesel diversifica el origen de las materias primas energéticas e implica por tanto una menor dependencia energética del petróleo y una mayor seguridad en el suministro. Finalmente, reduce las importaciones de crudo y ayuda a equilibrar la balanza de pagos. Otras de las ventajas es la posibilidad de la utilización de biodiesel obtenido a partir de aceites y grasas de fritura, con lo que se elimina un contaminante que presenta un fuerte impacto medioambiental.

I.5.2 Inconvenientes

A pesar de sus múltiples ventajas y beneficios, la utilización de biodiesel también presenta una serie de inconvenientes que son precisamente los que hay que superar para romper las barreras existentes para su comercialización.

I.5.2.1 Inconvenientes socioeconómicos

La mayor desventaja actual del biodiesel es su elevado coste de producción en comparación con los carburantes procedentes del petróleo, aunque ha ido disminuyendo con el tiempo debido a los continuos aumentos del precio del crudo. En algunos países el biodiesel tiene subvenciones y exenciones de impuestos de los Gobiernos, por lo que se puede comercializar a menor precio para los consumidores finales, ya que sin estas ayudas la producción de biodiesel no sería factible económicamente (Girard *et al.*, 2006; Wassell *et al.*, 2006; Frondel *et al.*, 2007). En EE.UU., el Departamento de Agricultura ha establecido una subvención para los productores que empleen aceite de soja como materia prima para la producción de biodiesel. En España, el biodiesel está exento del Impuesto Especial de Hidrocarburos, al menos hasta el 31 de diciembre de 2012, por lo que resulta un combustible más económico que el diésel tradicional. Esta exención tiene como objeto fomentar la utilización de los carburantes de origen agrícola, por sus ventajas energéticas y medioambientales, compensando así su mayor coste de producción.

I.5.2.2 Inconvenientes técnicos

El biodiesel presenta una mayor viscosidad que el diésel por lo que pueden surgir problemas de pérdidas de flujo a través de los filtros e inyectores. Si el flujo de combustible altera el *spray*, se puede formar hollín en el inyector o una dilución del lubricante (Demirbas, 2007). Debido a su mejor capacidad como disolvente con respecto al diésel, los residuos existentes en el depósito son disueltos y enviados al motor por la línea de combustible, pudiendo obstruir los filtros. Este hecho sólo se produce cuando se utiliza biodiesel por primera vez después de haber estado consumiendo diésel mineral, y es función del nivel de suciedad que haya en el motor y en el depósito de combustible.

El biodiesel presenta problemas para funcionar a bajas temperaturas. Generalmente, el punto de congelación (PC) y el punto de obstrucción de filtro en frío (POFF) son superiores al diésel, dependiendo de la materia prima con la que se produjo el biodiesel. A bajas temperaturas puede empezar a solidificar y formar cristales que pueden obstruir los conductos del biocombustible. Esto origina que el biodiesel no pueda emplearse en temporadas invernales pero sí en verano o en países tropicales (Benjumea *et al.*, 2009). Sin embargo, se pueden emplear aditivos en concentraciones elevadas para cumplir las exigencias de los gasóleos en invierno.

El poder calorífico inferior (PCI) del biodiesel es menor que el del diésel, por lo que la potencia del motor disminuye. El calor de combustión se reduce en, aproximadamente, un 12 % debido a la presencia de O₂ en la molécula, disminuyendo el par motor y la potencia en un 10 %, aunque este fenómeno no es tan evidente al compensarse con un mayor índice de cetano del biodiesel, siendo la combustión más completa con una menor compresión.

Por otro lado, pueden aparecer algunos problemas debido a corrosión y partículas de desgaste en el tanque, ya que el biodiesel es un producto hidrófilo y degradable. Los FAMES son más agresivos que el diésel con materiales como el caucho y los tipos más comunes de pinturas, aunque la gran mayoría de los vehículos que se comercializan actualmente son fabricados con componentes resistentes al biodiesel, como son aluminio, acero, acero inoxidable y polímeros como el teflón, nylon, vitón, cauchos fluorados, etc. Materiales como el cobre, latón, bronce, plomo, estaño y zinc tienen un efecto catalítico sobre el proceso de oxidación del biodiesel, formándose gran cantidad de sedimentos, depósitos en los inyectores y colmatación en los filtros, por lo que debe evitarse su uso en los elementos del sistema de combustible (Mittelbach *et al.*, 2003). De igual forma, si se utiliza B100 se recomienda que las pinturas del depósito de combustible y demás partes en contacto con el combustible se sustituyan por otras acrílicas (López Díaz, 2005).

Hasta el momento, no está claro el tiempo de vida útil del biodiesel; algunos autores sostienen que posee un tiempo de vida muy corto, mientras que otros afirman que su vida útil llega a igualar o superar los 10 años. Sin embargo, la bibliografía coincide en señalar que su vida útil depende de su manipulación y almacenamiento, por lo que es necesario consumirlo lo

antes posible una vez producido, o recurrir a aditivos (antioxidantes) que suponen un coste adicional.

I.6 Situación actual del biodiesel

I.6.1 Situación actual del biodiesel en el mundo

La producción de biocombustibles a nivel mundial ha crecido exponencialmente en los últimos años. Como ya se ha comentado, su desarrollo ha estado ligado a la subida del precio del petróleo, a las políticas de promoción adoptadas por los gobiernos de los distintos países y a la creciente concienciación social desarrollada en torno al cuidado medioambiental. El mundo apuesta actualmente por el biodiesel y por el bioetanol como alternativa a los combustibles de origen fósil, dado que ambos proceden de fuentes renovables y permiten reducir de modo significativo las emisiones de CO₂ a la atmósfera. El continente americano concentra más del 95 % de la producción mundial de bioetanol, mientras que la producción de biodiesel procede principalmente de la Unión Europea (UE). Según el Departamento de Biocarburantes del Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE) del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio de España, la producción mundial de biodiesel se ha multiplicado por 10 en los últimos 8 años hasta alcanzar prácticamente los 24 millones de toneladas durante el año 2010. En la Figura I.7 se muestra la evolución exponencial de la cantidad de biodiesel producida en el mundo durante los últimos 20 años.

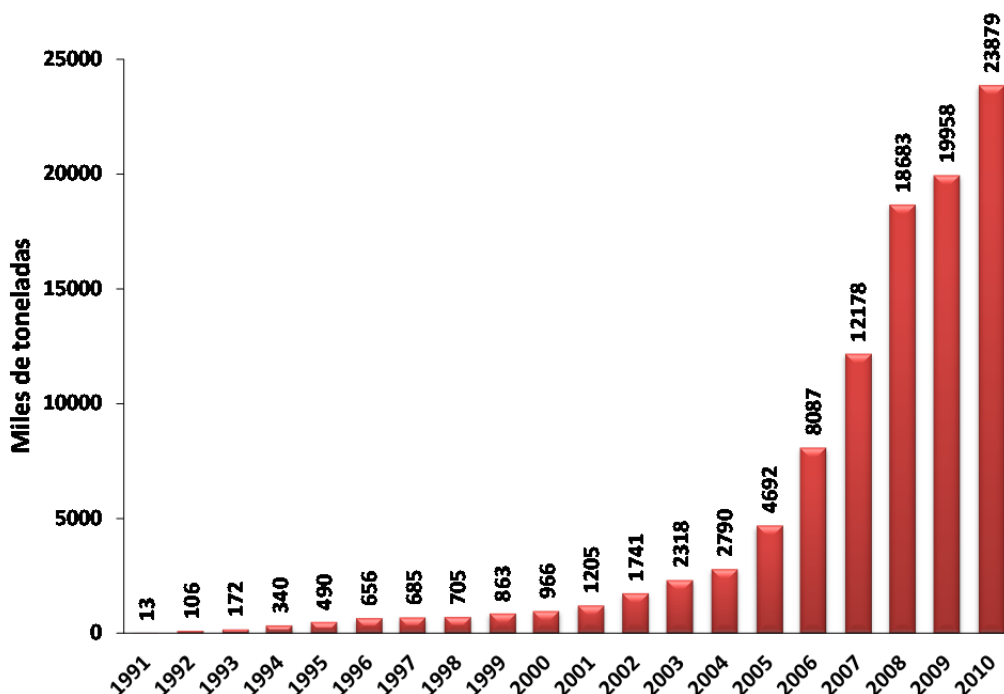


Figura I.7.- Producción mundial biodiesel, en toneladas, en el periodo 1991-2010.

Fuente: *Earth Policy Institute* y *F.O. Licht*.

La mayor parte del crecimiento en la producción de biodiesel se está originando principalmente en EE.UU., Brasil y Alemania, que reúnen más de la mitad de la producción

mundial de biodiesel. En 2009, Europa siguió liderando el mercado de biodiesel, con una cuota de producción de aproximadamente el 50 %. El segundo puesto lo ocupó el continente americano con una cuota cercana al 33 %. Los cinco principales países productores a nivel mundial durante el año 2009 fueron Alemania, EE.UU, Francia, Argentina y Brasil, que en su conjunto produjeron aproximadamente el 68 % del total del biodiesel que se elabora en el mundo. Australia es el mayor productor en la región Asia-Pacífico, seguido de China y la India (Infinitas Renovables, 2010). En la Figura 1.8 se muestra la producción de biodiesel por continentes durante el año 2009.

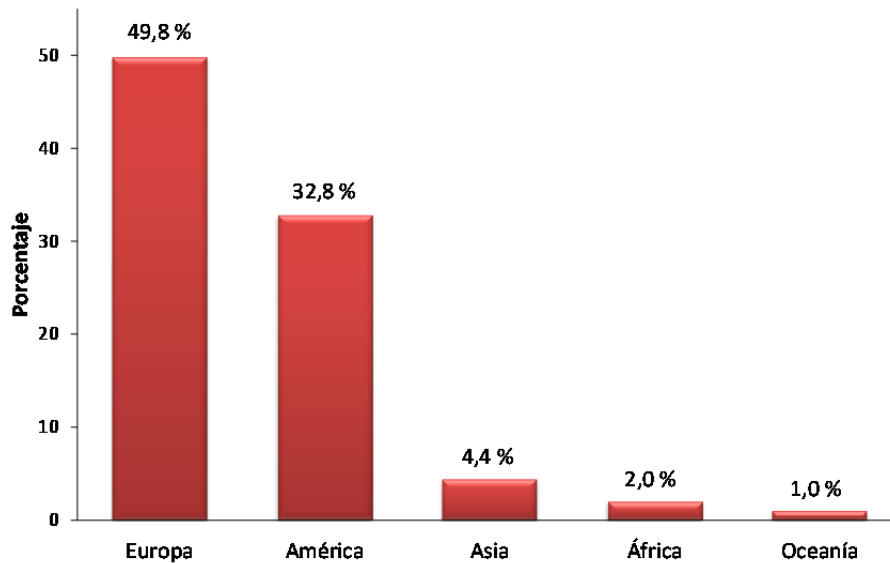


Figura 1.8.- Producción de biodiesel por continentes. Fuente: *Euroobserver* 2009.

La utilización de biodiesel como combustible permitirá sustituir o disminuir la importación de petróleo, asegurando el abastecimiento energético de los diferentes países. Sin embargo, una sustitución total en el contexto actual resultaría agrícolamente imposible. Según el Movimiento Mundial por los Bosques (WRM), se requerirían unos 26 millones de hectáreas de terreno para mover los coches y autobuses europeos con biodiesel. A nivel mundial, una sustitución completa del petróleo por biodiesel implicaría que la mayor parte de la superficie cultivable del planeta debería dedicarse a producir biocombustibles, así como enormes cantidades de agua potable, y no a producir alimentos, por lo que en la actualidad pensar que el biodiesel sea una alternativa real es una utopía. Es de vital importancia la toma de decisiones estratégicas que permitan seleccionar tipos de cultivo más adecuados para que ocupen la menor extensión de tierra posible, logrando el mayor rendimiento para la obtención de biocombustibles sin que esto produzca una merma en la oferta alimentaria.

La utilización de aceites procedentes de procesos de fritura como materia prima permitiría la eliminación de estos residuos, a la vez que impulsaría los parques automovilísticos. Otra alternativa muy interesante es el empleo de aceites producidos a partir de semillas oleaginosas no comestibles, es ya que permitiría la utilización de terrenos de cultivo actualmente en desuso, lo que generaría puestos de trabajo. Por último, la utilización

de microalgas es una de las alternativas que más beneficios están generando en los últimos años, debido a su enorme facilidad de reproducción y a la elevada cantidad de aceite que se puede extraer a partir de ellas para la producción de biodiesel.

Recientemente, se ha inaugurado en Singapur la mayor planta de producción de biodiesel del mundo, construida por la compañía finlandesa *Neste Oil*. La planta tiene una capacidad de producción de 800.000 toneladas anuales de biodiesel, obtenido a partir de aceite de palma de Malasia e Indonesia y grasa animal, y será exportado a los mercados de Europa, Canadá y EE.UU. Esta compañía ha desarrollado su propia tecnología para producir biocombustibles, denominada NExBTL, utilizando cualquier tipo de grasa vegetal o animal como materia prima

Según la revista *Biofuels International*, los biocombustibles podrían ser comercializados en EE.UU. en el sector del transporte aéreo a partir del año 2015, siendo previsible que aproximadamente el 1 % del combustible empleado en dicho sector proceda de biocombustibles, empleando unos 73 millones de litros. Este hecho ha provocado que las empresas del sector estén trabajando en la incorporación de la nueva mezcla sin que se produzcan efectos negativos en las aeronaves, al tiempo que se reduzcan las emisiones de CO₂ a la atmósfera.

I.6.2 Situación actual del biodiesel en Europa

Para tener una idea de la dimensión del proceso industrial de producción del biodiesel, resulta oportuno observar la reciente evolución de este mercado a nivel europeo. En julio de 2010 se contabilizaban en Europa 245 plantas de producción de biodiesel, lo que suponía un descenso del 13 % en el número de instalaciones respecto a 2009. Sin embargo, a pesar de este descenso, la capacidad de producción aumentó un 38 % en 2010, hasta alcanzar aproximadamente los 24 millones de toneladas. La causa de este desajuste se debe principalmente a que las plantas que han desaparecido han sido las de menor tamaño. Además, los proyectos de I+D+i y la experiencia adquirida durante estos últimos años han hecho posible que las instalaciones de biodiesel sean cada vez más productivas.

Alemania es el país con mayor capacidad de producción de biodiesel del mundo, a pesar de que su capacidad descendió en 280.000 toneladas en el año 2009. Durante el último año, España y Francia han reducido su capacidad de producción en aproximadamente, un 3 y un 1,5 %, respectivamente. Italia ha sido el país europeo que ha experimentado el mayor crecimiento en capacidad productiva en el mismo período, alrededor de un 25 %, mientras que otros países como Holanda, Polonia o Bélgica se encuentran a mayor distancia. En la Figura I.9 se muestra la capacidad de producción de biodiesel de los países de la UE durante los años 2008 y 2009.

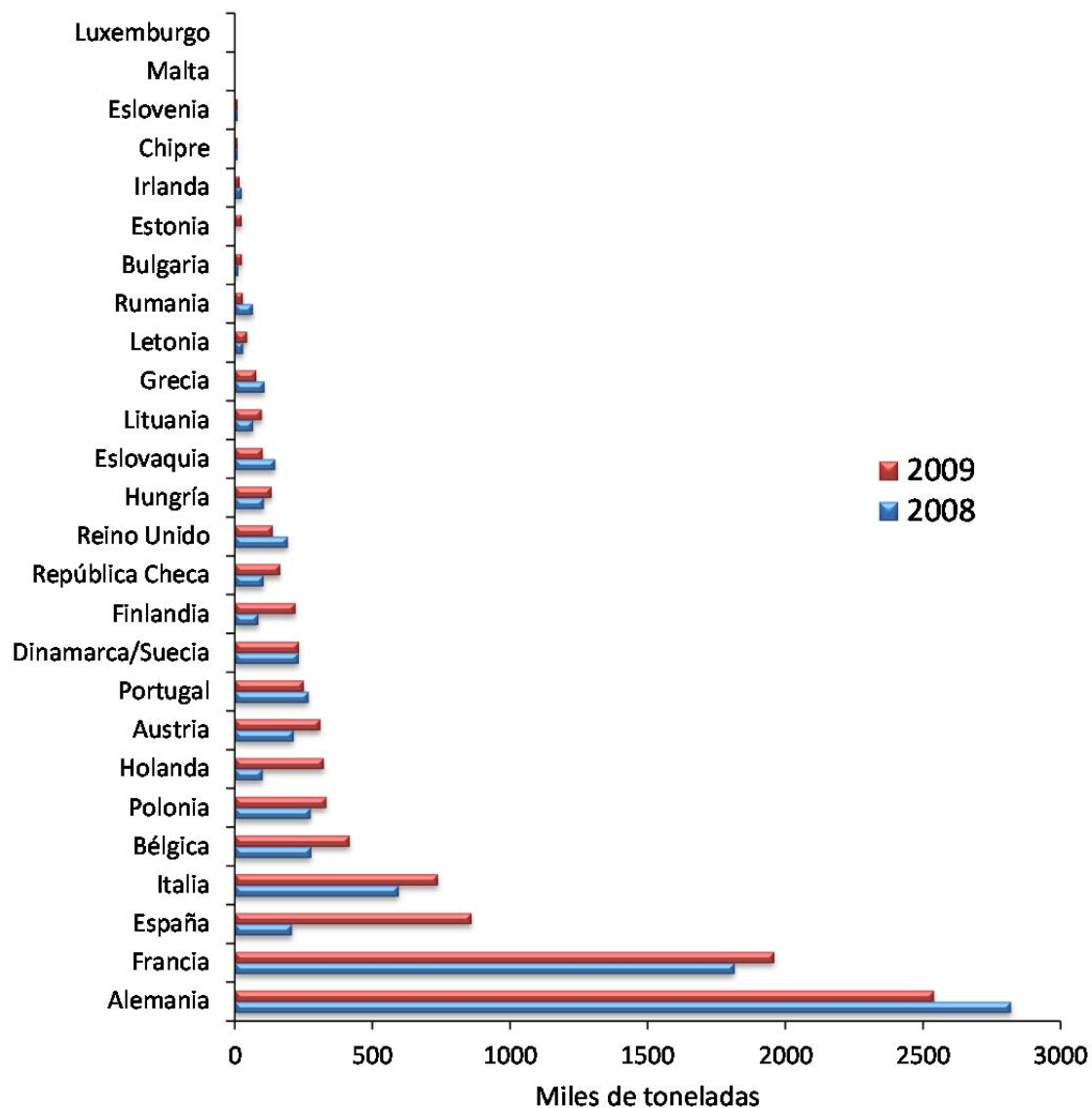


Figura I.9.- Capacidad de producción de biodiesel por países de Europa.
Fuente: *Euroobserver* 2009.

Según *European Biodiesel Board* (EBB), la industria europea del biodiesel continuó creciendo durante el año 2009. En total, se produjeron 9 millones de toneladas, un 17 % más que durante el año 2008. Asimismo, durante el año 2008 se obtuvieron en Europa, aproximadamente, 8 millones de toneladas, un 36 % más que durante el año 2007. España fue el país que experimentó el mayor crecimiento, pasando de 207.000 toneladas durante el año 2008 a 859.000 toneladas en el 2009, adelantando a países como Italia, Bélgica, Polonia o Portugal, entre otros, y pasando a ocupar la tercera posición en el ranking europeo de países productores. También incrementaron su producción Austria, Bélgica, Finlandia, Italia, Holanda y Polonia, mientras que Alemania, Grecia y Reino Unido redujeron su tonelaje. En Europa, el biodiesel continúa siendo el biocombustible más comercializado, logrando el 75 % del total de toneladas producidas.

A pesar de las medidas puestas en marcha para fomentar la producción de biocombustibles, ningún país europeo produce al 100 % de su capacidad. El principal productor de biodiesel, Alemania, tiene el 50 % de su capacidad detenida. El caso de España es especialmente llamativo, ya que tiene capacidad para generar un 80 % más de lo que produce en la actualidad. Estos datos ponen de manifiesto que las perspectivas de negocio sobre el mercado de los biocombustibles lanzaron a los productores a poner en marcha numerosas plantas que, en la actualidad, se encuentran cerradas o paradas como consecuencia de las dificultades a las que se enfrenta el sector para su consolidación. La UE ha aprobado el objetivo de un consumo mínimo de biocarburantes en todos los Estados Miembros del 10 % en relación a los carburantes destinados al transporte durante el año 2020, objetivo difícilmente alcanzable debido a las actuales normativas y a la influencia de los países productores de petróleo.

Las prácticas comerciales desleales en el mercado internacional del biodiesel continúan siendo el principal obstáculo de la industria europea, que está viendo cómo se frena su crecimiento y se desaprovecha su potencial. Este hecho, unido al despertar productivo de algunos países subdesarrollados, ha afectado gravemente la rentabilidad de los productores de biodiesel de la UE desde principios de 2007. Durante más de dos años, los productores de biodiesel europeos tuvieron que competir con importantes subvenciones y el *dumping* (introducción de un producto en un país a un precio inferior al del país de origen) de biodiesel de los EE.UU., conocido como B99. El biodiesel B99 se ha comercializado en Europa con un descuento considerable, incluso a menor precio que el aceite crudo de soja. Tras la aprobación por la UE, en marzo de 2009, de la imposición de medidas arancelarias *antidumping* contra el biodiesel B99, comenzaron a surgir prácticas similares, como la importación de biodiesel B19 (con mezclas artificiales) o la importación a través de varios países. Así, en los últimos meses se ha venido importando a Europa biodiesel de Canadá a un precio menor que la propia materia prima (aceite de soja y colza) y con dudas razonables sobre su verdadero origen (EE.UU.), situación que está siendo investigada por la UE. En julio de 2009, estas medidas *antidumping* fueron prorrogadas durante 5 años más con la aprobación del Consejo de Ministros Europeos.

Asimismo, las exportaciones de biodiesel de Argentina a Europa continúan en auge en perjuicio de los productores europeos. En 2009 se importaron a Europa 850.000 toneladas de biodiesel argentino, y en los cuatro primeros meses de 2010 ya se habían alcanzado las 260.000 toneladas. Esto es debido a la política argentina de impuestos diferenciales, que establece un incentivo fiscal artificial a la exportación de biodiesel, imponiendo menos impuestos al producto que a la materia prima, proporcionando mayor valor agregado al aceite de soja.

El compromiso de la UE para luchar contra el cambio climático y el calentamiento global del planeta se actualizó en 2009 con la aprobación de la Directiva 2009/28/CE, del 23 de abril, mediante la que se establece un marco común para el fomento de la energía procedente de fuentes renovables. Esta nueva normativa deroga las directivas 2001/77/CE, de fomento de

las energías renovables en la generación de electricidad, y la 2003/30/CE, sobre el uso de biocombustibles en el transporte. El texto fija los objetivos “nacionales obligatorios” para cada uno de los Estados Miembros sobre la cuota de energía procedente de fuentes renovables en el consumo final bruto para el horizonte del año 2020 y se ajusta el objetivo global “20-20-20”, es decir, reducir un 20 % el consumo de energía primaria en la UE y las emisiones de GEI y elevar la contribución de las energías renovables al 20 % del consumo. La lucha contra el cambio climático y la creciente dependencia del petróleo están promoviendo el desarrollo de investigaciones y proyectos tecnológicos que aporten nuevos métodos de producción de biodiesel.

La entrada en vigor, en diciembre de 2010, de la Directiva de Calidad del Combustible, 2009/30/CE, obliga a productores y comercializadores europeos a aplicar la normativa sobre la sostenibilidad de los biocombustibles. Esta directiva permitirá que biocombustibles y combustibles fósiles puedan competir en el mercado en igualdad de condiciones respecto a su emisión real de GEI, ya que contarán con el mismo sistema de medición. Así, los biocombustibles deberán garantizar una reducción mínima de GEI del 35 % en comparación con la gasolina y el gasóleo, porcentaje que aumentará al 50 % a partir del año 2017.

I.6.3 Situación actual del biodiesel en España

La mayor parte de la producción española de biodiesel procede de aceites de fritura, y el resto se elabora con aceite de soja importada y otros productos oleaginosos. Durante el año 2010, el número de plantas de producción de biodiesel en España se redujo de 53 a 46, debido a que los fabricantes españoles han tenido grandes dificultades para utilizar toda su capacidad industrial, dar salida comercial a su producción y rentabilizar sus inversiones por los mismos problemas que han tenido el resto países de la UE, dato que contrasta con el crecimiento continuado en el número de plantas que se ha registrado durante los últimos años. Castilla La Mancha es la Comunidad Autónoma que concentra el mayor número de plantas instaladas (Infinitas Renovables, 2010). Aunque el descenso en el número de plantas se situó en un 13 %, la capacidad productiva española tan sólo se redujo en un 3 %. En 2010, la capacidad de producción de las plantas de biodiesel en España superaba los 4 millones de toneladas al año, lo que situó a nuestro país como el segundo país europeo con mayor capacidad productiva. En la Figura I.10 se muestra la evolución de la capacidad de producción de biodiesel en España durante los últimos años.

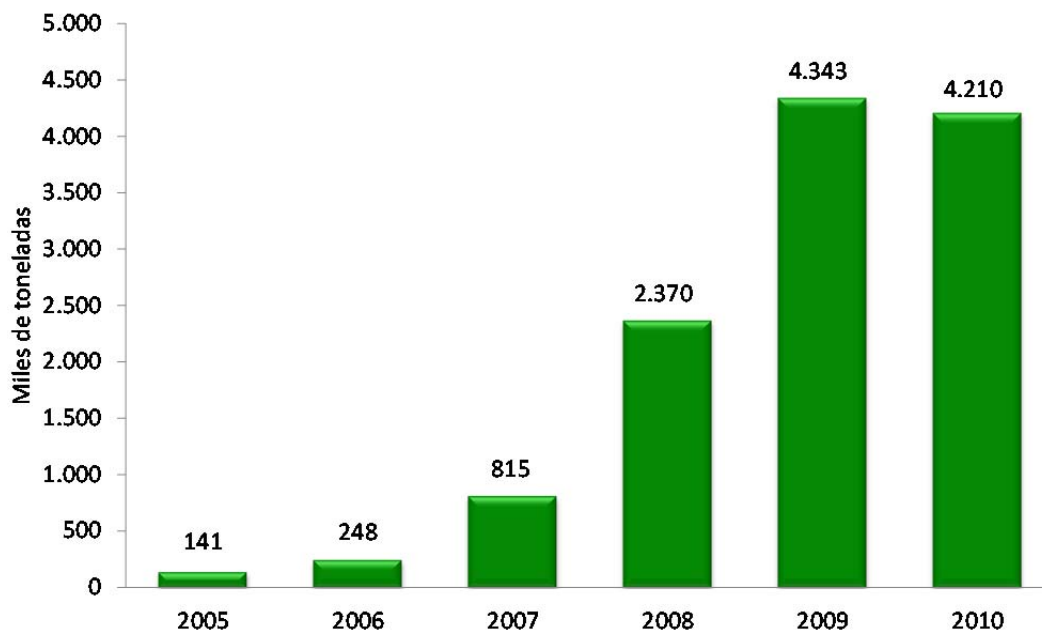


Figura I.10.- Evolución, en toneladas, de la capacidad de producción de biodiesel en España.

Fuente: *European Biodiesel Board*, 2010.

A pesar de tener instalada una gran capacidad de producción, los datos contrastan con el consumo de biodiesel que, según la Asociación de Productores de Energías Renovables (APPA), se ha multiplicado durante los últimos años. En esta línea se indica que el incremento del consumo no tuvo una repercusión directa sobre el mercado español debido a que la mayoría del biodiesel consumido en España proviene de importaciones desleales procedentes en su mayoría de Argentina e Indonesia. Los productores temen que si las autoridades españolas no lo remedian en breve, las importaciones desleales se harán con la totalidad del mercado español de biodiesel.

El cierre de plantas ha provocado que Andalucía deje de ser la comunidad con mayor capacidad productiva de biodiesel a favor de la Comunidad Valenciana, que concentra el 15 % de la capacidad española, debido a la presencia en Castellón de la mayor planta de producción de España. En la Tabla I.1 se muestran las plantas de producción de biodiesel en funcionamiento en España, a 31 de marzo de 2010, de mayor a menor capacidad de producción, así como las provincias donde se encuentran radicadas. En abril de 2011, se inauguró una nueva planta de biodiesel en León, de la empresa Vecernegy Bida Toreno S.L., con una capacidad productiva de 120.000 toneladas anuales, utilizando como materia prima aceites vegetales, incluidos los procedentes de fritura, así como grasas animales.

Tabla I.1.- Plantas de biodiesel en funcionamiento en España a 31 de marzo de 2010.
(Fuente: <http://www.appa.es>).

EMPRESA	LOCALIDAD	PROVINCIA	CAPACIDAD (t/a)
Infinita Renovables	Castellón	Castellón	600.000
Infinita Renovables	Ferrol	La Coruña	300.000
Bioenergética Extremeña 2020	Valdetorres	Badajoz	250.000
Bio Oils Huelva I	Palos de la Frontera	Huelva	250.000
Iniciativas Bioenergéticas	Calahorra	La Rioja	250.000
Biodiesel Bilbao	Zierbena	Vizcaya	200.000
Saras Energía	Cartagena	Murcia	200.000
Biocombustibles de Zierbana	Zierbena	Vizcaya	200.000
Entaban Biocomb. Galicia	Ferrol	La Coruña	200.000
Abengoa San Roque	San Roque	Cádiz	200.000
Combustibles Ecológicos Biotel	Barajas de Melo	Cuenca	150.000
Biocom Energía	Algemés	Valencia	110.000
Greenfuel Extremadura	Los Santos de Maimona	Badajoz	110.000
Biocarburantes CLM	Ocaña	Toledo	105.000
Linares Biodiesel Technology	Linares	Jaén	100.000
Biodiesel Aragón	Altorricón	Huesca	100.000
Sdad. Coop. Gral. Agrop. Acor	Olmedo	Valladolid	100.000
Biodiesel Caparrosa	Caparrosa	Navarra	70.000
Bionet Europa	Reus	Tarragona	50.000
Entaban Biocomb. Guadalquiv.	Sevilla	Sevilla	50.000
Ecoproductos Cast. La Mancha	Montalbo	Cuenca	50.000
Biodiesel Castilla La Mancha	Santa Olalla	Toledo	45.000
Biocombustibles de Cuenca	Cuenca	Cuenca	40.000
Energía Gallega Alternativa	Cerceda	La Coruña	40.000
Combunet	Monzón	Huesca	40.000
Bionor Berantevilla	Berantevilla	Álava	36.000
Biocarburantes de Galicia	Begonte	Lugo	35.000
Grupo Ecológico Natural	Llucmajor	Baleares	33.000
Stocks del Vallès	Montmeló	Barcelona	31.000
Biodiesel de Andalucía 2004	Fuentes de Andalucía	Sevilla	30.000
Solartia	Los Arcos	Navarra	28.500
Hispanergy Puertollano	Puertollano	Ciudad Real	25.000
Hispanergy del Cerrato	Herrera de Valdecañas	Palencia	25.000
Entaban Biocomb. del Pirineo	Alcalá de Gurrea	Huesca	25.000
Bionorte	San Martín del Rei	Asturias	25.000
Biocarburantes Almadén	Almadén	Ciudad Real	21.000
Biocarburantes de Castilla	Valdescorriel	Zamora	20.000
Diesol	Alcalá de Henares	Madrid	15.000
Comb. Ecol. Mediterráneo	Elda	Alicante	10.000
Biocomb. de Castilla y León	San Cristóbal de Entrevías	Zamora	6.900
Albabío Andalucía	Níjar	Almería	6.000
Biocarburantes de Almazora	Cuevas de Almazora	Almería	6.000
Biodiesel Carburantes	Carranque	Toledo	6.000
Bercam	Los Yébenes	Toledo	6.000
Bioteruel	Albalate del Arzobispo	Teruel	5.000
Transportes Ceferino Martínez	Vilafant	Gerona	5.000
TOTAL			4.210.400

En la Figura I.11 se muestra la capacidad de producción de biodiesel por Comunidades Autónomas en España.

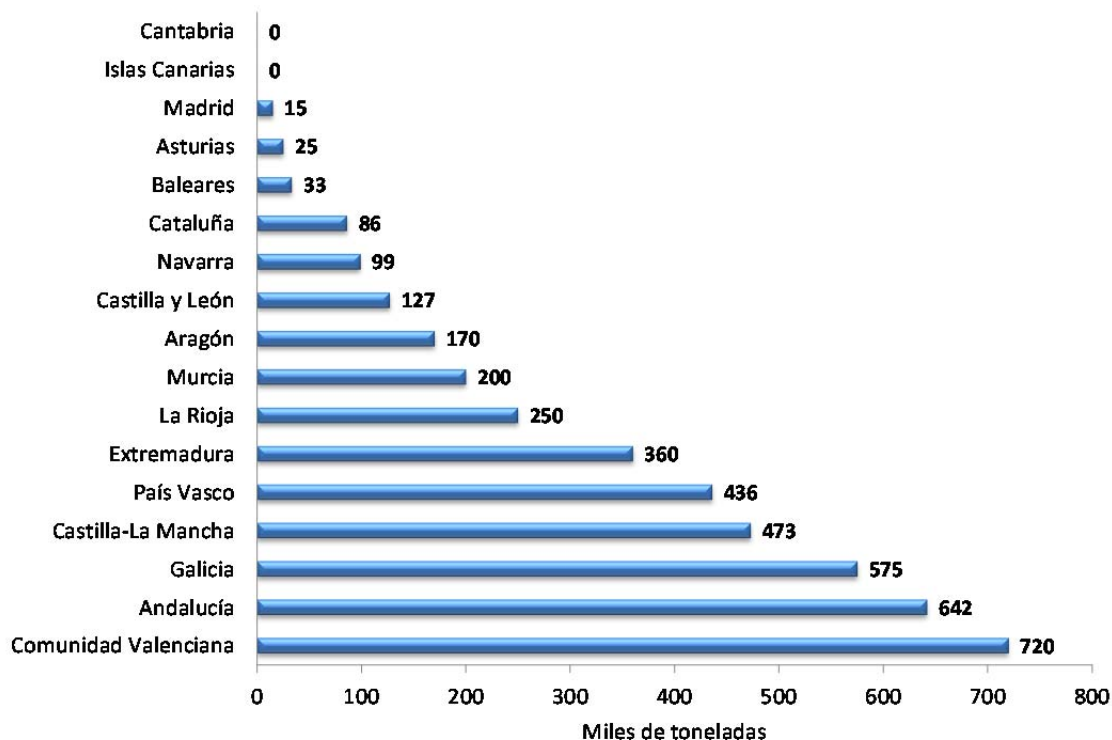


Figura I.11.- Capacidad de producción de biodiesel por Comunidades Autónomas en España durante el año 2010. Fuente: *European Biodiesel Board*, 2010.

En Cantabria no hay ninguna planta de producción de biodiesel, aunque la empresa General de Biocarburantes S.A. tenía previsto la instalación de una planta con una capacidad de producción de 150.000 toneladas por año, aunque todavía no ha entrado en funcionamiento. En las Islas Canarias aún se está lejos de los inicios y despegue en el consumo de biodiesel, ya que la situación geográfica del archipiélago y los precios no han motivado el desarrollo de esta alternativa energética. No obstante, se están realizando estudios para la introducción del biodiesel en las islas.

El crecimiento en la capacidad de producción no ha ido acompañado de una evolución similar en el consumo de biocarburantes, por lo que para incentivar su consumo se han tomado varias medidas, entre las que destaca la aprobación de la Orden ITC/2877/2008, de 9 de octubre, por la que se estableció un mecanismo de fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables para el transporte. De esta forma, el consumo de biodiesel en España durante el año 2009 se incrementó en un 142 % con respecto al 2008. Según datos de APPA, el consumo superó durante ese año, por primera vez, la barrera del millón de toneladas como consecuencia de la entrada en vigor de la obligatoriedad en el uso de biocombustibles.

Durante el año 2010 el consumo de biodiesel ascendió a 1.213.747 toneladas, siendo importado el 60 % del biodiesel consumido en España. Actualmente, las plantas españolas sólo producen el 20 % de su capacidad. Las causas de este bajo nivel de producción son,

principalmente, que los fabricantes españoles siguen teniendo que hacer frente a las importaciones de biodiesel procedentes de otros países donde la producción está subvencionada (Argentina, Canadá o Indonesia) y al retraso en la adopción de medidas que fomenten el consumo de biocombustibles en España. En la Figura I.12 se muestra la evolución del consumo de biodiesel en España en el periodo 2005-2010, observándose como el consumo procedente de importaciones ha ido aumentando anualmente.

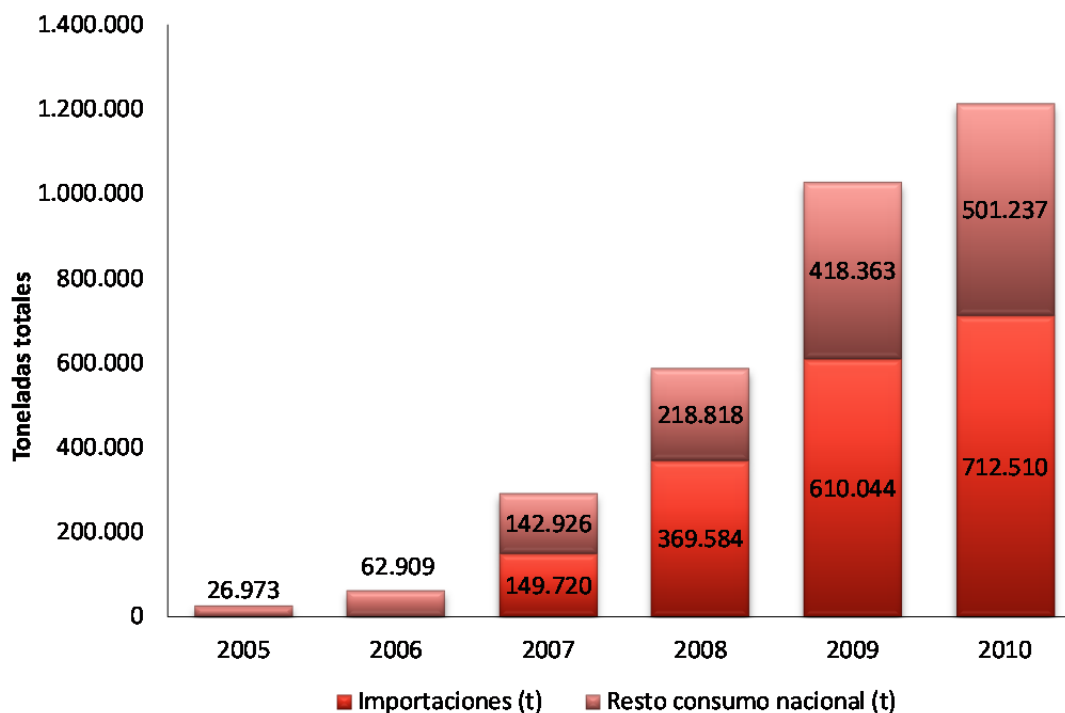


Figura I.12.- Evolución del consumo de biodiesel en España en el periodo 2005-2010.

Fuente: CORES y APPA biocarburantes.

Cabe mencionar que la actitud política es fundamental para fomentar el uso de los biocombustibles, pero en la actualidad el Gobierno de España no ha presentado una opinión concreta sobre este tema. Por un lado, debe señalarse la reciente decisión del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio de rebajar la obligación global de biocarburantes de 2010 desde el 5,83 % hasta el 4,78 % en términos energéticos. Con esta medida, que adoptó a principios de 2011 mediante una Resolución de la Secretaría de Estado de Energía, España ha incumplido el objetivo mínimo de biocarburantes fijado por la Directiva Europea de biocarburantes de 2003 (5,75 %), objetivo que, aumentando hasta el 5,83 %, había quedado recogido en el Plan de Energías Renovables 2005-2010 y hecho obligatorio en 2007 mediante una reforma de la Ley del Sector de Hidrocarburos. Por otro lado, el Gobierno había aprobado mediante el Real Decreto 1738/2010, de 23 de diciembre de 2010, unos objetivos obligatorios de biocarburantes para los próximos años de 5,9 %, 6,0 % y 6,1 % para 2011, 2012 y 2013, respectivamente.

Debido a la actual crisis energética, el Consejo de Ministros de 25 de febrero de 2011 modificó las obligaciones sobre el uso de los biocarburantes para 2011 hasta un 7 % en

términos energéticos sobre el conjunto de gasolinas y gasóleos de automoción, lo que incrementará las obligaciones previstas para 2012 y 2013. Los productores consideran esta nueva medida como positiva, pero resulta inútil para disminuir la dependencia energética del exterior si el Ministerio de Industria, Turismo y Comercio no muestra la misma decisión política para aprobar de inmediato el proyecto de Orden Ministerial, presentado en octubre de 2010, para evitar las importaciones desleales de biocarburantes, apoyar la sostenibilidad económica del sector e impulsar la producción de biodiesel nacional. La aprobación de esta medida permitiría a las plantas españolas poder producir biodiesel, al tiempo que podrían competir en el mercado nacional e internacional. Además, se espera que esta rectificación del Gobierno, respecto a lo aprobado el 23 de diciembre de 2010, sea el primer paso de una política de biocarburantes más ambiciosa, que permita seguir incrementando los objetivos de consumo hasta el 10 % en el periodo 2013-2014 y poder alcanzar así el objetivo del 20 % de consumo marcado por la UE para el año 2020 (APPA Biocarburantes, 2010, 2011).

En la actualidad, la empresa española *Bio Fuel Systems* (BFS) ha conseguido un sistema de conversión de energía que permite la producción masiva y sostenible del primer biopetróleo existente en el mundo mediante un “Acelerador Bio Electromagnético”, que incrementa el crecimiento de las microalgas y recupera la energía captada durante la fotosíntesis con una extrema eficacia de transferencia energética. Partiendo de cepas de microalgas de origen natural, pero adaptadas y modificadas posteriormente para que presenten una elevada tasa de reproducción y producción de compuestos energéticos (fitoplancton, diatomeas, clorofíceas) con tiempos para la cosecha entre 8 y 24 horas, esta empresa ha obtenido cantidades de biomasa superiores a los que se consiguen con cualquier otro sistema en el que se emplean cultivos terrestres (palma, girasol, colza), así como sistemas convencionales de crecimiento de microalgas mediante los fotobioreactores, lo que garantiza una alta eficacia de su sistema. De esta forma, se podrían producir 95 millones de barriles de biopetróleo al día, en una superficie de 50.000 km². Esto resulta una alternativa a los combustibles de origen fósil, ya que no sería necesaria una gran superficie de terreno para producir este biocombustible.

1.6.4 Situación actual del biodiesel en las Islas Canarias

La situación de las Islas Canarias con respecto a la implantación de plantas de producción de biodiesel ha sufrido algún revés durante los últimos años. En 2007 la empresa Biodiesel Canarias S.L. presentó un proyecto de instalación de una planta de fabricación de biodiesel para el transporte en la zona franca del Puerto de la Luz, en Las Palmas de Gran Canaria. El funcionamiento de la instalación se centraba en la utilización de aceite de soja, colza, girasol, etc. procedente de Brasil y Argentina, pero el objetivo final era la utilización de *Jatropha curcas* como materia prima, con la que se produce el doble de cantidad de aceite y biodiesel de mejor calidad. Dicho proyecto fue avalado por la Zona Especial Canaria, pero

nunca llegó a buen fin, puesto que apareció publicado en el BORME la extinción de la mencionada empresa el pasado mes de octubre.

Mediante Resolución de Viceconsejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial del Gobierno de Canarias nº 31, de 8 de febrero de 2010, se otorga Autorización Ambiental Integrada (AAI) a la empresa DISA renovables S.L.U., para la implantación de una planta de biodiesel a partir de aceites vegetales comestibles, no comestibles y de fritura en el polígono industrial de Granadilla, en el sur de Tenerife (BOC, 2010/096). El permiso se otorga a la empresa para producir, a partir de aceites vegetales, 150.000 toneladas anuales de biodiesel. La AAI es una licencia que deben tener aquellas empresas que realizan actividades industriales contaminantes en las Islas Canarias, con el objetivo de reducir la contaminación de la atmósfera, del agua y del suelo, para alcanzar un nivel elevado de protección del medio ambiente. Posteriormente, y mediante Resolución nº 245, de 12 de mayo de 2010, se otorga otra AAI a la entidad Biodiesel Lanzarote S.L. en relación al proyecto básico correspondiente a la instalación denominada "Instalaciones de Biodiesel Lanzarote" en el término municipal de Arrecife, Lanzarote (BOC, 2010/114). De esta forma, se instalarán en las Islas Canarias las primeras dos plantas para la producción de biodiesel.

Por otra parte, la empresa DISA S.L. está impulsando desde 2007 un ambicioso proyecto para la obtención de biodiesel a partir de *Jatropha curcas* en las Islas Canarias. El Proyecto "DISA Biocombustible *Jatropha*" se centra, por un lado, en desarrollar biocombustible a partir del aceite de *Jatropha*, una planta de origen caribeño cultivada en Fuerteventura y, por otro, en la recuperación medioambiental de suelos degradados de la isla para ayudar así a reducir el problema de la desertización. Estas directrices, según detalla el proyecto de DISA, están contenidas en la "Estrategia de Sostenibilidad: Energía y Agua", en el ámbito del Plan Energético de Canarias (PECAN) y en la Convención de Naciones Unidas de Lucha contra la Desertización. El Proyecto nació en 2007 con la firma de un convenio entre DISA y la Universidad de La Laguna, con la colaboración de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y el apoyo del Cabildo de Fuerteventura, que ha cedido los terrenos para la plantación piloto, así como del Gobierno de Canarias.

Las conclusiones obtenidas en una primera fase del proyecto, desarrollada entre 2007 y 2010, han sido positivas ya que se ha observado que el cultivo de la *Jatropha curcas* es viable en la isla de Fuerteventura debido a su clima y a la existencia de terrenos baldíos, no útiles para otros cultivos. En esta primera fase, se ha experimentado sobre el crecimiento de la *Jatropha curcas* y se han estudiado las variedades que mejor responden a las condiciones climáticas del territorio de la isla de Fuerteventura, distintos tipos de regadío, productividad, abonos y posibles enfermedades de las plantas. El objetivo de la segunda fase del proyecto, que se prolongará hasta 2014, es incorporar al estudio el riego con aguas regeneradas y analizar el método más adecuado para la extracción del aceite, su rendimiento, composición y aprovechamiento del biocombustible obtenido a partir de ella. Si finalmente se lograra el objetivo de hacer posible la explotación industrial del primer biocombustible netamente

canario, supondría la creación de una nueva industria, diversificación agrícola, creación de empleo, nuevas estructuras del transporte y uso del agua, recuperación de suelos degradados, posibles cultivos de forrajes para la ganadería de la isla y un impacto positivo en el PIB canario.

I.7 Utilización de aceites de fritura como materia prima

Los aceites de fritura son considerados actualmente como una de las alternativas más económicas para la producción de biodiesel, y con su utilización se evitarían los enormes gastos económicos que supone su tratamiento como residuo. Además, los aceites de fritura presentan un gran nivel de reutilización y muestran una buena aptitud para su aprovechamiento como biocombustible (Agarwal, 2007). El aceite de cocina procedente de procesos de fritura es uno de los grandes responsables de la contaminación de las aguas subterráneas, fluviales y marinas, así como de la vida que en ellas habita, formando en la superficie del agua una película difícil de eliminar, que afecta al intercambio de O₂ y altera el ecosistema.

Los aceites residuales de cocina proceden principalmente de restaurantes, cafeterías, hospitales, hoteles, industrias alimentarias, comedores colectivos o de puntos limpios para su reciclaje. Su coste puede ser hasta un 60 % inferior al de los aceites refinados, dependiendo de la fuente y la disponibilidad, o incluso nulo (Predojevic, 2008). En la actualidad y gracias a la concienciación ciudadana, los ayuntamientos españoles están promoviendo la recogida de este residuo generado en los domicilios particulares, pero el porcentaje de aceite recogido sigue siendo muy inferior al consumido, por lo que debe fomentarse que este residuo no acabe por los desagües de los hogares españoles.

Estos aceites tienen propiedades tanto del aceite crudo como del refinado. El calor y el agua aceleran la hidrólisis de los triglicéridos, por lo que el contenido de FFA en el aceite aumenta. La materia insaponificable, la viscosidad y la densidad aumentan considerablemente debido a la formación de dímeros y polímeros, pero el índice de yodo y la masa molecular disminuyen (Enweremadu *et al.*, 2009), por lo que el aceite de fritura requiere de varias etapas de acondicionamiento, previas a la reacción de transesterificación, produciendo un incremento en los costos de producción (Canakci *et al.*, 2008). A pesar de estos problemas, los aceites reciclados son considerados como una de las alternativas con mejores perspectivas en la producción de biodiesel, ya que es la materia prima más barata, y con su utilización se evitarían los costes de su tratamiento como residuo.

Los estudios sobre la utilización de aceite de oliva para producir biodiesel son prácticamente inexistentes, estando limitados a aquellos en los cuales este aceite procede de procesos de fritura (Dorado *et al.*, 2003a, 2003b, 2004). Este hecho se debe a que el aceite de oliva tiene, casi exclusivamente, un uso alimentario, lo que le confiere un elevado valor económico que hace innecesario diseñar mercados alternativos para los excedentes. A pesar de ello, este aceite puede tener muy diversas calidades, desde el virgen extra hasta el de orujo.

Recientemente se ha asociado la existencia de benzopirenos al aceite de orujo de oliva, que lo convierten en inadecuado para el consumo humano por la elevada toxicidad de estos productos. Por ello, el biodiesel abre nuevas posibilidades para estos aceites de oliva de difícil comercialización.

España es un gran consumidor de aceites vegetales, principalmente de oliva y girasol. Estos aceites presentan un bajo nivel de reutilización, por lo que no sufren grandes alteraciones y muestran una buena actitud para su aprovechamiento como biocombustible. Los datos de consumo en España se sitúan en torno al millón de toneladas, lo que implica una producción de aceites de fritura en torno a las 750.000 toneladas al año. La estructura de este consumo se caracteriza por un peso muy elevado del sector hogar, alrededor del 70 % del total, y el resto corresponde al sector hostelero e industrial (López Díaz, 2005). Además, como valor añadido, la utilización de aceites de fritura se traduce en signos de una buena gestión medioambiental, pero su recogida es problemática. La Comisión Europea propone que los Ministerios de Medio Ambiente y los Ayuntamientos creen un sistema de recogida de aceite frito, oleínas y grasas a tres niveles (industrial, hostelero y doméstico), con especial atención a su control y trazabilidad.

En el caso de España, dicha recogida no está siendo promovida enérgicamente por la Administración Pública, pese a que la Ley 10/98 de Residuos establece la prohibición de verter aceites de fritura, lo cual es un incentivo más para su utilización en la fabricación de biodiesel. De igual forma, en las Islas Canarias se estableció la Ley 1/1999, de 29 de enero, de Residuos con los mismos objetivos y con la premisa de que los residuos se revalorizarán y eliminarán sin poner en riesgo la salud de las personas y sin emplear procedimientos ni métodos que puedan perjudicar al medio ambiente. En la Tabla I.2 se muestran las toneladas de los diferentes tipos de aceites importados a las Islas Canarias, durante el periodo 2006-2010.

Tabla I.2.- Cantidad de aceite importada a las Islas Canarias, en toneladas, durante el periodo 2006-2010. Fuente: Instituto Canario de Estadística (ISTAC) a partir de datos de la Agencia Tributaria.

Tipos de aceite	2006	2007	2008	2009	2010
Soja y sus fracciones	10.471,9	8.256,5	11.688,5	6.080,9	5.154,3
Aceite de cacahuete	0,04	0,14	0,91	0,10	19,50
Oliva y sus fracciones	17.763,7	18.938,5	17.408,7	16.474,4	19.246,2
Otros a partir de aceituna	491,1	421,1	366,0	393,7	543,1
Palma y sus fracciones	2.390,8	2.060,5	2.096,8	2.052,1	1.811,6
Girasol y sus fracciones	13.424,9	14.196,2	12.859,6	15.761,4	13.896,7
Coco, palmiste, babasú	1,7	1,4	5,2	9,0	3,9
Nabina, colza, mostaza	651,1	0,5	10,3	1,3	130,9
Jojoba y otras aceites vegetales	998,8	770,4	1.312,4	931,1	894,6
Otras grasas animales o vegetales	9.146,7	9.490,5	9.955,8	9.646,7	10.332,5
TOTAL (t/año)	55.340,9	54.135,7	55.704,3	51.350,8	52.033,3

En esta tabla se observa que el aceite importado mayoritariamente durante los últimos cinco años ha sido el aceite de oliva, seguido por el de girasol. Según Enweremadu *et al.* (2009) y Math *et al.* (2010), aproximadamente el 70 % del aceite empleado en las cocinas puede utilizarse para la producción de biodiesel, siempre que exista un adecuado sistema de recolección de este residuo. Suponiendo que todo el aceite importado durante un año sea consumido ese mismo año, se puede establecer, de forma aproximada, que el residuo de aceite vegetal generado en Canarias durante el periodo 2006-2010 osciló entre 35.946 y 38.993 toneladas al año, por lo que se justificaría su aprovechamiento para la obtención de biodiesel, máxime habitando en un territorio limitado cuyo principal problema es la eliminación de los residuos contaminantes de los acuíferos de las islas, ayudando a disminuir las emisiones de CO₂ a la atmósfera y sin necesidad de enviarlos a la Península para su revalorización.

En Tenerife, existen al menos dos empresas que recogen aceites y grasas procedentes de procesos de fritura, cuyo objetivo es la recogida y posterior reciclaje del aceite para su transformación en biodiesel, generalmente en plantas de la Península al no existir, en la actualidad, plantas de biodiesel en las islas. Una de estas empresas es RECYOIL, que ha instalado contenedores especiales, de color naranja, para la recogida de este residuo urbano donde los vecinos de algunos municipios tinerfeños pueden depositar el aceite empleado en los domicilios particulares en botellas de plástico, con capacidades comprendidas entre 1 y 8 litros. La otra empresa es REAGRA, que es un gestor autorizado para la recogida de aceites procedentes de procesos de fritura en muchas localidades de España. El tratamiento del residuo queda centralizado en la planta que esta empresa tiene en Reus, donde se eliminan las impurezas propias de su procedencia y, gracias a la colaboración de Bionet Europa, se transforma en biodiesel. Además, en cada isla hay una serie de puntos limpios, cuya gestión depende de los correspondientes Cabildos, en donde los ciudadanos pueden depositar los restos de aceite de fritura en contenedores de polietileno y, posteriormente, se envían a una planta de tratamiento de aceites para la obtención de biocombustibles.

1.8 Utilización de aceites vegetales como biocombustible

Desde que se planteó la posibilidad de emplear los aceites vegetales como combustible en los motores diésel, han surgido diversas alternativas. Entre ellas destacan su uso sin sufrir ninguna modificación, su mezcla con diésel de origen fósil o la alteración química de estos aceites mediante dilución, microemulsión, pirólisis o por transesterificación, que es la empleada más frecuentemente (Meher *et al.*, 2006a; Enweremadu *et al.*, 2009).

La utilización de aceites vegetales sin modificación alguna como combustible en motores diésel provoca diversos problemas, como taponamiento de filtros, líneas e inyectores, depósitos de carbón en la cámara de combustión (inyector, pistón y culata), excesivo desgaste del motor, degradación del aceite lubricante por polimerización, etc. Otra opción que se plantea en la bibliografía es la modificación de los motores actuales para ser adaptados al

empleo de aceites vegetales como combustibles alternativos (motores con precámara o con sistemas de precalentamiento de aceite). Con objeto de paliar los problemas que suponía el empleo de aceites vegetales sin modificar, se propuso la utilización de mezclas de aceites y diésel en distintas proporciones (Narayan *et al.*, 2002). La elevada viscosidad de los aceites (aproximadamente 10 veces más que la del diésel) fue un factor limitante para su utilización como combustible sin modificación, debido a que implicaba una pobre atomización del combustible y se obtenía una combustión incompleta. No obstante, existen varios procesos que permiten reducir la viscosidad de los aceites hasta valores cercanos a los del diésel tradicional para que puedan ser empleados como combustible en un motor diésel, como son la microemulsión, pirólisis, dilución y reacción de transesterificación.

I.8.1 Microemulsión

La formación de microemulsiones, iónicas y no iónicas, permite solucionar el problema de la elevada viscosidad de los aceites vegetales. Las microemulsiones son dispersiones coloidales termodinámicamente estables formadas por dos líquidos normalmente inmiscibles, en las que el diámetro de las partículas de la fase dispersa está entre 1 y 150 nm.

En el caso de los aceites, la microemulsión consiste en la suspensión del aceite vegetal, finamente dividido, en otro combustible líquido en el que no sea soluble, normalmente un alcohol. De esta forma, una microemulsión de metanol con aceite vegetal puede funcionar tan bien como el gasóleo. La viscosidad del aceite se reduce para mejorar la combustión y disminuir la formación de gomas. Las microemulsiones son estables a temperaturas por debajo de -10 °C, siempre que el contenido de agua no supere el 1 %, y reducen en gran medida la viscosidad de los aceites. Sin embargo, el empleo de microemulsiones no se ha extendido debido al bajo poder calorífico del combustible resultante.

I.8.2 Pirólisis

La pirólisis consiste en un cambio químico causado por la aplicación de calor, en ausencia de O₂, dando lugar a la descomposición térmica o craqueo del producto en compuestos más simples. Así, la pirólisis del aceite crudo implica la ruptura de los enlaces químicos de los componentes del aceite, mediante su calentamiento en atmósfera inerte, con objeto de obtener moléculas más pequeñas. Los aceites se empiezan a descomponer a una temperatura de aproximadamente 250 °C, probablemente debido a que los dobles enlaces sufren ciertas reacciones térmicas. La escisión ocurre si la temperatura supera los 300 °C.

Los biocombustibles así obtenidos presentan una elevada acidez, la cual provoca la corrosión de los aceros que se encuentren en contacto con ellos, siendo poco estables con el tiempo. Aunque de esta forma se consigue disminuir la viscosidad, ésta sigue siendo alta y, además, aparecen otras moléculas que ensucian los inyectores por la acción de los radicales. Este proceso incrementa la emisión de NO_x y CO al disponer de una relación elevada combustible/aire.

I.8.3 Dilución

La dilución es otra alternativa que consiste en la mezcla de aceites vegetales puros con gasolina (14 %) y etanol (5 %), cuya mezcla se puede utilizar como combustible en los motores diésel, con resultados similares a los gasóleos comerciales. La dilución de los aceites vegetales puede ser realizada utilizando el mismo diésel o metanol. Sin embargo, la utilización de esta técnica implica una dependencia de combustibles fósiles para la obtención del combustible final.

I.8.4 Reacción de transesterificación

Tradicionalmente, el biodiesel se ha obtenido mediante un proceso de transesterificación de aceites o grasas. La reacción de transesterificación o alcoholisis de un aceite vegetal, ya sea sin usar o procedente de procesos de fritura, es aquella en la que una molécula de triglicérido, componente mayoritario del aceite, reacciona con un alcohol de baja masa molecular o de cadena corta, en presencia de un catalizador adecuado que aumente la velocidad del proceso, para producir FAMES y glicerina. En la Figura I.13 se muestra el esquema general de la reacción de transesterificación de aceite vegetal con metanol (metanolisis).

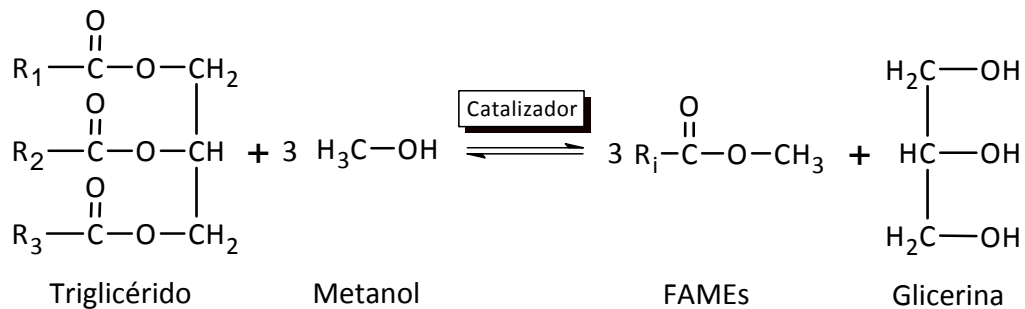
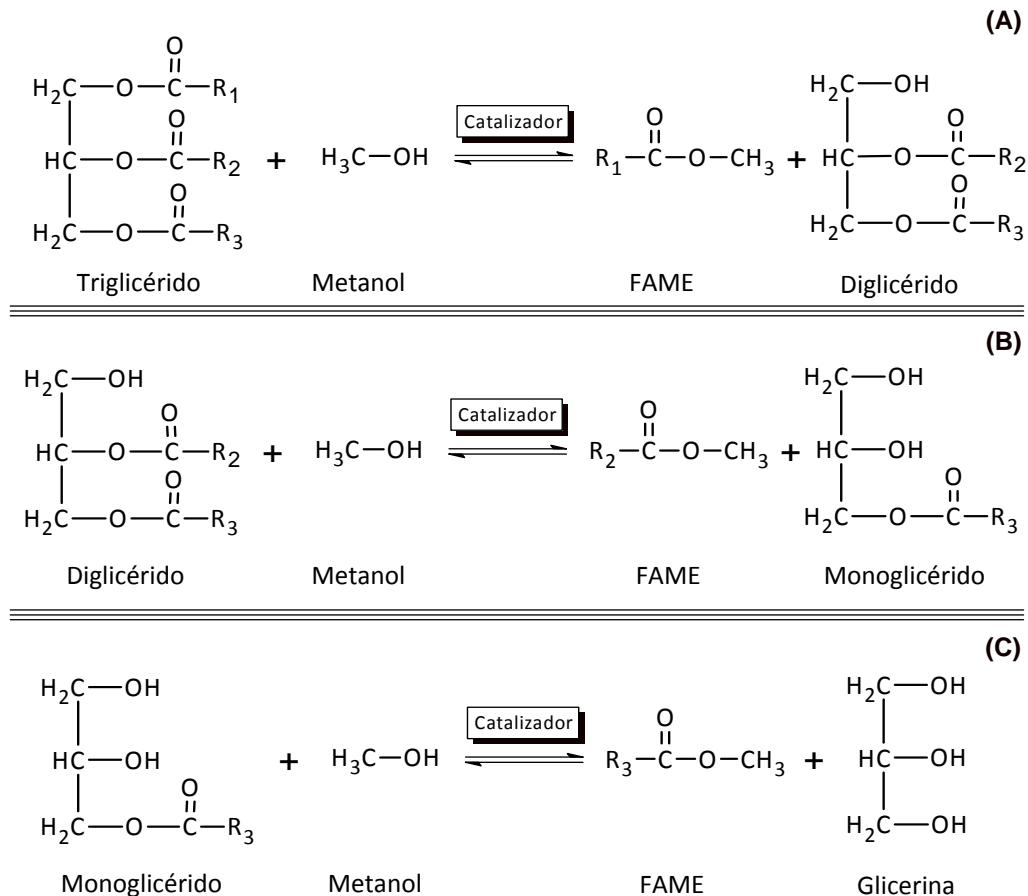


Figura I.13.- Representación esquemática de la reacción de transesterificación de aceites vegetales con metanol (metanolisis).

Según la estequiometría de la reacción, por cada mol de triglicérido transesterificado se necesitan tres moles de metanol, obteniéndose tres moles de FAMES y uno de glicerina. En la práctica, se ha comprobado que añadiendo un exceso de metanol se consigue desplazar el equilibrio hacia la formación de FAMES, consiguiendo así un elevado rendimiento del proceso. La reacción de transesterificación de aceites vegetales con metanol consta de tres reacciones consecutivas reversibles en las que el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerina. En cada reacción se libera una molécula de FAME (Kee Lam *et al.*, 2010). En la Figura I.14 se muestra la secuencia de etapas que tiene lugar durante la transesterificación de un aceite vegetal con metanol.



R_i: Cadena carbonada del ácido graso

Figura I.14.- Representación esquemática de las etapas de la reacción de transesterificación de aceite vegetal con metanol para producir ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerina.

La reacción de transesterificación se produce en presencia de un catalizador homogéneo, que puede ser de carácter ácido o alcalino, heterogéneo, como resinas u óxidos metálicos, e incluso enzimático. Esta reacción se lleva a cabo generalmente con calentamiento y agitación vigorosa para asegurar un contacto íntimo entre reactivos y disminuir así efectos de transferencia de masa. Por lo tanto, esta reacción supone la transformación de las moléculas de triglicéridos, que son grandes y ramificadas, en moléculas de FAMES, que son lineales, no ramificadas, más pequeñas y muy similares en tamaño a los componentes del diésel. Los FAMES y la glicerina son productos inmiscibles y se distribuyen en dos fases después de la reacción, separándose mediante decantación y centrifugación. Este procedimiento se utiliza para reducir considerablemente la elevada viscosidad de los triglicéridos, facilitando su empleo como combustible alternativo al diésel (Meher *et al.*, 2006b; Albuquerque *et al.*, 2009; Demirbas, 2009; Murugesan *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010).

I.8.4.1 Variables que afectan a la reacción de transesterificación

Las principales variables que afectan a la reacción de transesterificación son la calidad y la pureza de las materias primas, el tipo de alcohol, la temperatura, la concentración de

catalizador, la relación molar alcohol:aceite, el grado de agitación y el contenido en humedad y FFA (Mittelbach *et al.*, 2004).

I.8.4.1.1 Calidad y pureza de las materias primas

La obtención de un biodiesel de buena calidad requiere que el aceite empleado sea lo más refinado posible, debe estar exento de material sólido libre y en suspensión y debe poseer un bajo contenido de FFA, en especial cuando se emplean catalizadores homogéneos, ya que el exceso de estos ácidos se puede ver reflejado en una baja conversión en la reacción. La presencia de ciertas sustancias coloidales o sólidos en suspensión generan reacciones competitivas con el catalizador o el alcohol, además de dificultar el proceso de separación y purificación. Entre estas sustancias pueden destacarse las pectinas, resinas, gomas, fosfatidos, proteínas, sustancias mucilaginosas, etc.

La procedencia de los aceites puede ser variada y su principal diferencia radica en la composición de la molécula de triglicérido, es decir, el tipo de ácido carboxílico unido al esqueleto carbonado del glicérido, y en la cantidad de FFA. Como ya se ha comentado anteriormente, las materias primas convencionales son los excedentes de producción de aceites de semillas oleaginosas, que presentan un elevado coste y los mencionados problemas asociados con la alimentación. Los aceites no comestibles son una alternativa interesante para la producción de biodiesel. Así, por ejemplo, el aceite obtenido a partir de *Brassica carinata*, que es una semilla oleaginosa con un elevado contenido en ácido erúrico, provoca problemas cardiovasculares y no puede utilizarse para la alimentación.

Otra de las materias primas que se puede emplear en la producción de biodiesel es el aceite procedente de procesos de fritura. Es una alternativa muy atractiva, si se tiene en cuenta el bajo coste de la materia prima, generado por la recolección, transporte y almacenamiento de la misma hasta la realización del proceso de transformación. El aceite de fritura se debe tratar antes de iniciar la reacción de transesterificación, con procesos de filtración para eliminar residuos sólidos contenidos en el aceite, disminuir la acidez y secarlo a una temperatura entre 100 y 104 °C o con sulfato de magnesio (Felizardo *et al.*, 2006). El aceite, así como los otros reactivos empleados (catalizador y alcohol), deben ser esencialmente anhidros, ya que el agua favorece la formación de jabones mediante procesos de saponificación, dificultando la purificación del biodiesel (Canakci *et al.*, 2001; Knothe *et al.*, 2005).

I.8.4.1.2 Tipo de alcoholes

Los alcoholes más empleados en la reacción de transesterificación son etanol (Pisarello *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011), metanol (Helwani *et al.*, 2009; Ferella *et al.*, 2010), butanol (Pappu *et al.*, 2011) e isopropanol (Chang *et al.*, 2009), siendo el metanol y el etanol los más empleados en la bibliografía. De todas formas, el metanol suele ser el más empleado debido a sus ventajas químicas y a su bajo coste con respecto a los demás alcoholes mencionados, los

cuales requieren relaciones molares y temperaturas elevadas para obtener buenos rendimientos.

Aunque el metanol es tóxico e inflamable, su empleo se prefiere al butanol debido al pequeño tamaño de las moléculas de metanol, lo que facilita el ataque simultáneo de éste sobre la molécula de triglicérido, al no existir impedimentos de tipo estérico. Por otro lado, la polaridad del anión metóxido es mucho mayor que la del anión butóxido, lo que favorece la reacción. El metanol y el etanol no son miscibles con los triglicéridos a temperatura ambiente, por lo que es necesario agitar mecánicamente para favorecer la transferencia de masa. Sin embargo, durante el transcurso de la reacción se produce la formación de emulsiones, que se transforman en una fase homogénea al formarse los FAMES. En el caso de la metanolisis, dichas emulsiones son fáciles y rápidamente disueltas tan pronto se forman cantidades considerables de glicerina, formando una fase inferior rica en glicerina y una superior rica en FAMES, mientras que son más estables en el caso de la etanolisis, complicando algo más el proceso de separación y purificación de los FAMES (Meher *et al.*, 2006b).

Una de las desventajas del empleo del metanol es su origen, ya que alrededor del 90 % del mismo se obtiene a partir de gas natural. De esta forma, el biodiesel no contribuiría a los aspectos ambientales y de sostenibilidad al tener un componente fósil aportado por el alcohol. Para que el biodiesel se convierta en un combustible realmente “verde”, es necesario un método alternativo de producción de metanol que no dependa de los combustibles fósiles. El profesor E. Tsang, de la Universidad de Oxford, ha desarrollado recientemente un nuevo método para producir metanol a partir de la glicerina, obtenida como subproducto de la reacción de transesterificación. Este nuevo método está basado en la hidrogenolisis catalítica de la glicerina bajo condiciones suaves: 100 °C de temperatura y una presión de H₂ de 20 bares (Isis Innovation, 2008).

1.8.4.1.3 Temperatura y tiempo de reacción

La reacción de transesterificación puede ocurrir a presión atmosférica y a diferentes temperaturas, dependiendo del tipo de aceite empleado como materia prima. A medida que la temperatura aumenta, también lo hace el rendimiento de la reacción. Sin embargo, después de un determinado tiempo, en función del tipo de materia prima, el cambio de temperatura no afecta de manera considerable al rendimiento del proceso (Meher *et al.*, 2006b). Por lo general, la transesterificación se realiza cerca del punto de ebullición del metanol (60-70 °C), pero también se ha estudiado con temperaturas que varían desde 25 hasta 250 °C (Fukuda *et al.*, 2001). El biodiesel puede ser producido mediante métodos a alta presión, por ejemplo, a 100 bares y 250 °C empleando grandes volúmenes de metanol, sin necesidad de pretratamiento del aceite, o en condiciones supercríticas a 350 °C y 43 MPa, pero los elevados costes de los equipos hacen que no sean viables a nivel industrial.

En cuanto al tiempo de reacción, a medida que éste crece, se incrementa la conversión de la reacción, pudiendo variar en función del catalizador empleado (Fangrui *et al.*, 1999). Los tiempos alcanzados por diferentes autores en la bibliografía varían en el rango de 30 minutos hasta 20 horas. La velocidad de reacción se incrementa con el tiempo y la conversión de biodiesel se ve afectada de manera directa por aumentos de temperatura (Meher *et al.*, 2006b). Experimentalmente, se ha encontrado que, con una buena agitación, el avance de la reacción es prácticamente nulo para tiempos superiores a 90 minutos (Darnoko *et al.*, 2000).

I.8.4.1.4 Naturaleza del catalizador

El empleo de catalizadores resulta indispensable para que la reacción de transesterificación sea favorable desde un punto de vista cinético. Si no se empleara catalizador, la temperatura de reacción debería estar por encima de 250 °C (Fukuda *et al.*, 2001). Las condiciones y operaciones de separación posteriores a la reacción de transesterificación se determinan por la naturaleza y cantidad de catalizador empleado, en función del tipo de materia prima usada.

Los catalizadores empleados en el proceso de producción de biodiesel se pueden clasificar en homogéneos, heterogéneos y enzimáticos. Los catalizadores homogéneos son solubles en el medio de reacción, es decir, se encuentran en una sola fase (líquida o gaseosa) y los tiempos de reacción son inferiores a los obtenidos mediante la catálisis heterogénea, en la que existen dos fases y una superficie de contacto.

I.8.4.1.5 Relación molar alcohol-aceite

Una de las variables más importantes que afectan al rendimiento de la reacción de transesterificación es la relación molar entre el alcohol y los triglicéridos, es decir, la cantidad de moléculas de alcohol necesarias para reaccionar con una molécula de aceite. Sin embargo, la transesterificación es una reacción de equilibrio reversible, es decir, se necesita un gran exceso de alcohol para desplazar la reacción hacia los productos. Por esto, en la práctica, cuando se trabaja con metanol se recomienda una relación molar de 6:1 para asegurar una conversión máxima de los triglicéridos a FAMES. En el caso del etanol, algunos estudios indican que una relación molar de 9:1 sería la más apropiada. Si la cantidad de alcohol no es suficiente, el producto contendrá monoglicéridos y diglicéridos (productos intermedios de la transesterificación), los cuales cristalizan muy fácilmente en el biodiesel y pueden originar la obstrucción de los filtros, lo que ha llevado a concluir que, hasta cierto límite, las relaciones molares altas generan mayores conversiones en tiempos cortos.

La reacción es incompleta para relaciones molares inferiores a 6:1, mientras que para una relación 15:1, la separación de la glicerina es difícil y la producción de FAMES disminuye, debido a que una porción de glicerina permanece en la fase biodiesel. Por lo tanto, una relación molar alta puede interferir negativamente en el proceso de separación de la glicerina, debido al aumento de la solubilidad de ésta en el alcohol. La relación molar óptima se debe

determinar experimentalmente, ya que depende del tipo y calidad del aceite empleado (Vicente *et al.*, 2007a, 2007b).

I.8.4.1.6 Grado de agitación

Los aceites son inmiscibles con la mezcla alcohol-catalizador, por lo que es necesario emplear agitación para facilitar el mezclado entre las dos fases y llevar a cabo la reacción sin limitaciones debidas a transferencia de masa, ya que si la agitación es pobre, la conversión de los triglicéridos en FAMES es reducida. La agitación mecánica es el método de homogeneización más utilizado, ya que permite el contacto íntimo de los reactivos, logrando muy buenos resultados.

La agitación con ultrasonidos de baja frecuencia, con formación de una emulsión entre el aceite y el alcohol, es otro método de homogeneización de los reactivos. Otra alternativa es la adición de un disolvente común al alcohol y al aceite, como el tolueno, fracciones de hidrocarburos alifáticos o tetrahidrofurano. Sin embargo, el consumo de disolvente es muy elevado, incrementando los costes de producción, ya que el disolvente se debe recuperar al final de la reacción mediante destilación de los FAMES (Mittelbach *et al.*, 2004).

I.8.4.2 Cinética de la reacción

Generalmente, la reacción de transesterificación de aceites vegetales se realiza en presencia de un catalizador, aunque también se ha estudiado en condiciones supercríticas y en ausencia de catalizador o por métodos enzimáticos.

I.8.4.2.1 Transesterificación catalítica. Clasificación

En las reacciones de transesterificación, la velocidad de la reacción se incrementa mediante el empleo de catalizadores de diferente naturaleza y comportamiento, que originan diversas modificaciones de las condiciones de reacción. Como se ha comentado, los catalizadores de la reacción pueden ser homogéneos, tanto alcalinos como ácidos, heterogéneos y enzimáticos.

I.8.4.2.1.1 Transesterificación mediante catálisis homogénea alcalina

La reacción de transesterificación realizada con un catalizador homogéneo alcalino es más rápida que cuando se emplea uno ácido y necesita condiciones de operación más moderadas. En la Figura I.15 se muestra un esquema del mecanismo de la reacción de transesterificación homogénea alcalina para los triglicéridos.

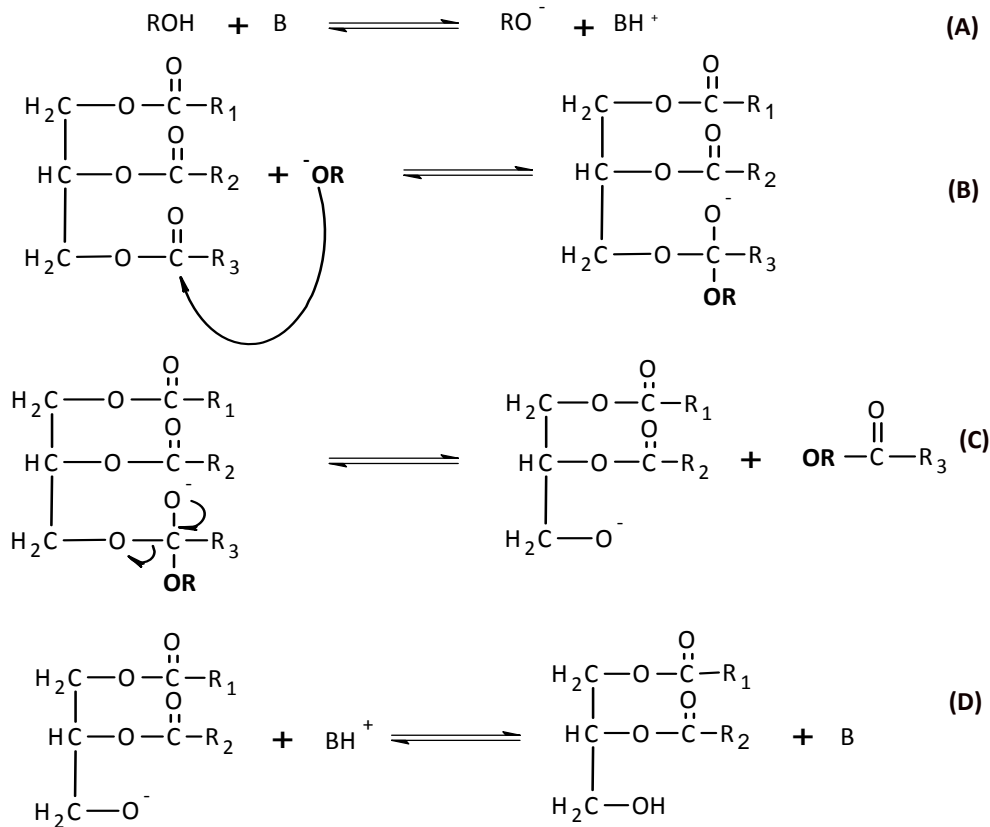


Figura I.15.- Mecanismo de la reacción de transesterificación por catálisis alcalina para los triglicéridos.
 ROH: Alcohol; B: Catalizador alcalino; R₁, R₂ y R₃: Cadenas alifáticas.

La primera etapa del mecanismo de reacción empleando un catalizador alcalino consiste en la reacción entre el catalizador y el alcohol para producir un ión alcóxido y el catalizador protonado (A). A continuación, se produce el ataque nucleofílico del ión alcóxido sobre el grupo carbonilo del triglicérido, produciendo un tetraedro como intermedio de reacción (B), a partir del cual se genera una molécula de FAME y el correspondiente anión del diglicérido (C). El último paso es la desprotonación del catalizador, regenerándose y reaccionando con otra molécula de alcohol y comenzando el ciclo de nuevo (D). Los di- y monoglicéridos se convierten en una mezcla de FAMEs y glicerina a partir del mismo mecanismo.

A nivel industrial, la transesterificación homogénea alcalina es el proceso preferido para producir biodiesel, debido a que estos catalizadores son menos agresivos que los ácidos, actúan más rápidamente y requieren pequeños volúmenes de metanol. Las bases fuertes como el hidróxido sódico (NaOH) y el hidróxido potásico (KOH) son los catalizadores más empleados y no se requieren condiciones experimentales muy severas. El proceso requiere de una materia prima de alta calidad, por lo que es preciso que la humedad de los reactivos sea mínima para evitar reacciones secundarias de saponificación, neutralización e hidrólisis. Además, los catalizadores deben mantenerse en estado anhidro, por lo que se debe evitar su contacto con el aire, ya que éste disminuye su efectividad debido a la humedad y al CO₂

(Meher *et al.*, 2006b). La Figura I.16 muestra las reacciones de saponificación, hidrólisis y neutralización que se pueden originar al emplear un catalizador homogéneo.

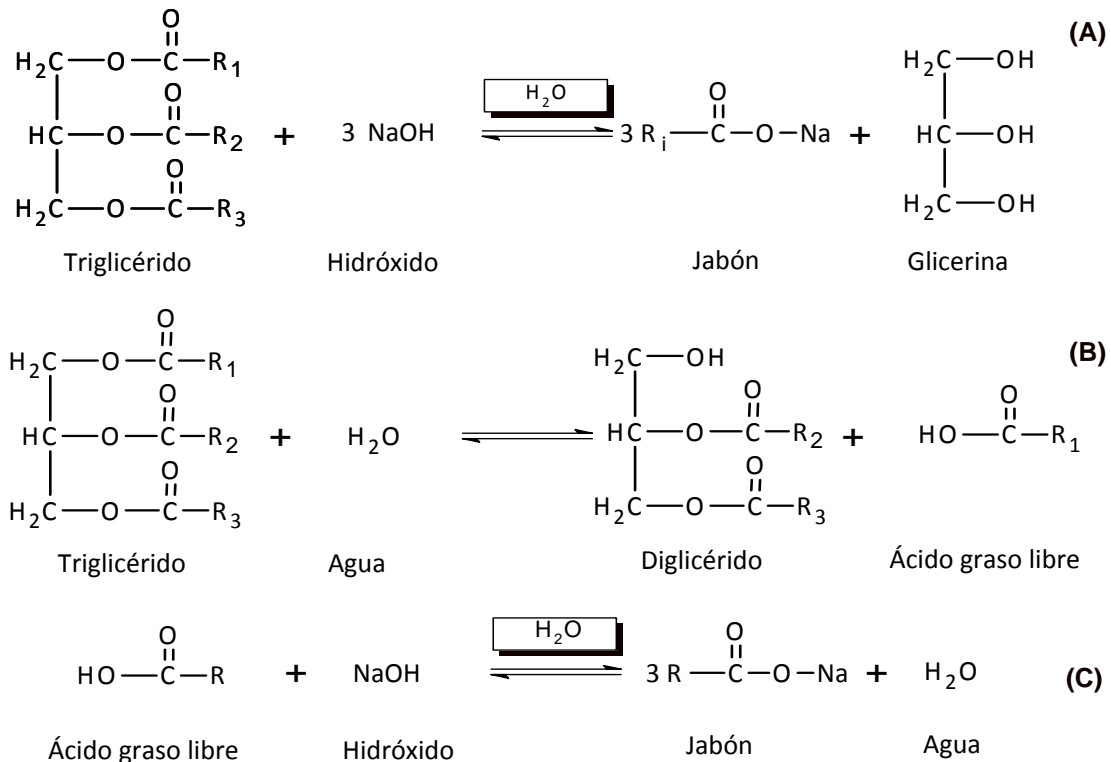


Figura I.16.- Reacciones de saponificación (A) y de hidrólisis de triglicéridos (B), y de neutralización de ácidos grasos libres (C).

Como se observa en la Figura I.16, el triglicérido en presencia de agua reacciona con el catalizador alcalino, consumiéndolo y originando la reacción de saponificación del mismo. Esta reacción se ve favorecida cuando se emplea NaOH o KOH como catalizadores, puesto que sus moléculas contienen grupos OH responsables de la formación de jabones. Por el contrario, cuando se emplean metóxidos de sodio o potasio como catalizadores, que sólo contienen el grupo OH como impureza, no se originan prácticamente jabones ya que no producen agua sobre la reacción con los alcoholes. Por otra parte, la presencia de agua puede originar la hidrólisis del triglicérido en diglicérido y formar FFA, que se pueden neutralizar reaccionando con el catalizador y originando jabón. La formación de jabones consume parcialmente el catalizador, disminuye el rendimiento de la reacción y dificulta las etapas de separación y purificación. Es necesario evitar todos estos procesos para obtener un biodiesel que cumpla con las especificaciones de calidad. Además, se debe prestar especial atención a las condiciones de reacción, especialmente a la temperatura y concentración de catalizador, para reducir al máximo la saponificación (Dias *et al.*, 2008).

Cuando la materia prima es un aceite con un elevado contenido en FFA, como los aceites de fritura y la mayoría de los no comestibles, no es posible transesterificar eficientemente con catalizadores alcalinos. En estos casos es necesaria una etapa previa de preesterificación ácida, que permita reducir el contenido de estos FFA a valores inferiores a

1 mg KOH g⁻¹ para poder transformarse en biodiesel, evitando la formación de jabones, lo que aumentará el costo de su producción, pudiendo disminuir el rendimiento de los FAMES presentes en el biodiesel a valores inferiores a los requeridos por los estándares de calidad establecidos en la normativa europea UNE-EN 14214:2009 (Sahoo *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Haas, 2005). En una segunda etapa, es necesario realizar una catálisis alcalina para transformar los restos de triglicéridos a FAMES (Dorado *et al.*, 2002). Al igual que la transesterificación alcalina, la reacción de preesterificación se ve afectada por la presencia de agua, disminuyendo su rendimiento (Mosser, 2009).

Las grasas animales contienen elevados contenidos de ácidos grasos saturados, los cuales se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente, lo que origina problemas en el proceso de producción de biodiesel al tener que licuar las grasas, aumentando los costes de elaboración del biocombustible (Leung *et al.*, 2010).

En la bibliografía consultada se han encontrado muchos trabajos en los que se emplea NaOH, KOH, NaOCH₃ y KOCH₃ como catalizadores de la reacción de transesterificación de aceites de fritura y refinados, pero los resultados no son uniformes debido a que cada aceite tiene un comportamiento diferente, aunque sea de la misma naturaleza. Los valores oscilan entre 0,4 y 1,5 % (m/m) siendo necesario su optimización en cada caso (Felizardo *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2008).

1.8.4.2.1.2 Transesterificación mediante catálisis homogénea ácida

En el caso de los catalizadores homogéneos ácidos, la reacción de transesterificación está catalizada por un ácido de Brönsted, como puede ser el H₂SO₄, H₃PO₄ o HCl, entre otros. Estos catalizadores proporcionan un elevado rendimiento en FAMES, pero la reacción es muy lenta, por lo que no se suele emplear a nivel industrial, requiriendo condiciones de temperatura y presión elevadas.

Los catalizadores ácidos pueden ser utilizados para la transesterificación directa de los FFA. Cuando el índice de acidez es superior al 5 %, los jabones dificultan la separación de la glicerina de los FAMES, contribuyendo a la formación de emulsiones durante la etapa de lavado del biodiesel. El principal problema que presenta la catálisis ácida es el elevado tiempo de reacción que se necesita (varias horas), así como elevadas cantidades de alcohol (relación molar metanol-aceite 15:1 o superiores), condiciones que no la hacen viable económicamente. Además, los catalizadores ácidos son mucho más corrosivos para los equipos que los alcalinos (Mittelbach *et al.*, 2004). En la Figura I.17 se muestra el mecanismo de la reacción de transesterificación homogénea ácida (Schuchardt *et al.*, 1998).

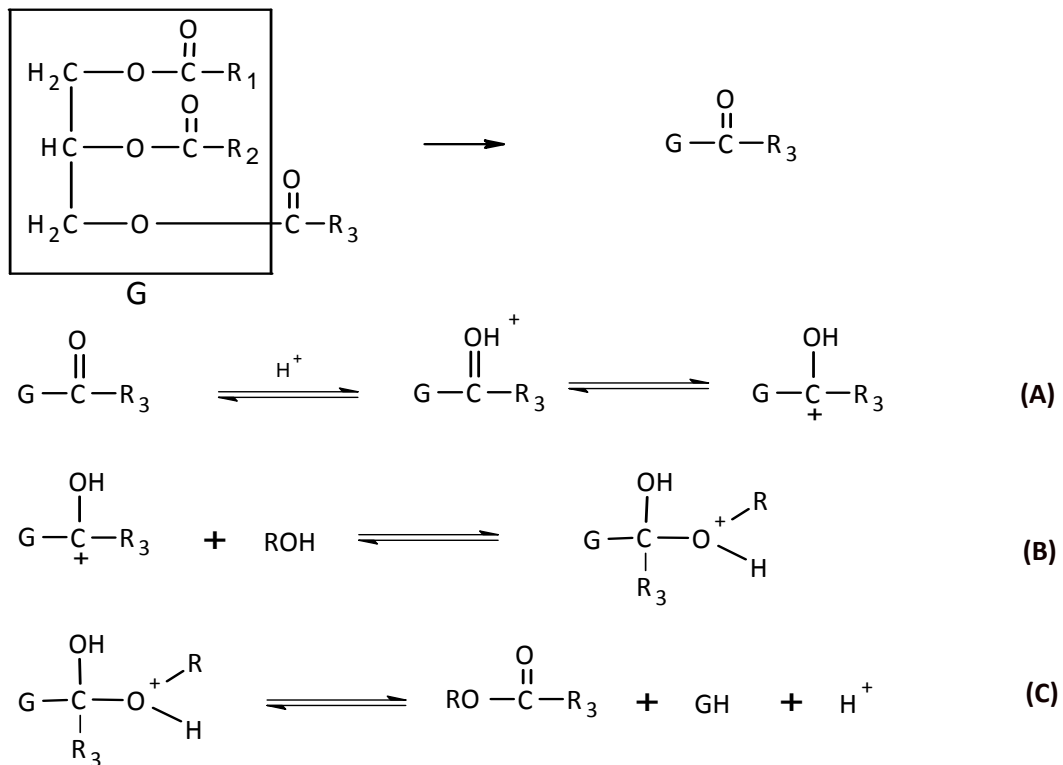


Figura I.17.- Mecanismo de la reacción de transesterificación mediante catálisis ácida para los triglicéridos. ROH: Alcohol; R_1 , R_2 y R_3 : Cadenas alifáticas.

En la catálisis ácida ocurre un mecanismo similar al que se produce en la catálisis alcalina, existiendo la transferencia de un protón. En primer lugar, ocurre la protonación del oxígeno del grupo carbonilo del triglicérido, generando un carbocatión (A). Así, el carbono es más electrofílico para el ataque nucleófilo del alcohol, formándose un intermediario tetraédrico (B), el cual es desprotonado por otra molécula de alcohol, formando el nuevo éster y el respectivo diglicérido y regenerando el catalizador ácido (C). Estas etapas se repiten de forma análoga para los intermedios di- y monoglicérido.

I.8.4.2.1.3 Transesterificación mediante catálisis heterogénea

I.8.4.2.1.3.1 Catalizadores sólidos

Los catalizadores heterogéneos son aquellos que se encuentran en un estado diferente al de los reactivos, es decir, que no se encuentran disueltos en el alcohol o en el aceite, sino que son sólidos fácilmente recuperables (Helwani *et al.*, 2009). La principal ventaja del uso de estos catalizadores es que simplifica y hace más económico el proceso final de purificación del biodiesel, debido a la fácil separación de los productos y reactivos mediante decantación o filtración, existiendo la posibilidad de recuperar su actividad mediante regeneración. Además, se eliminan los problemas de corrosión asociados a los catalizadores ácidos y el posterior tratamiento de los desechos líquidos (Kim *et al.*, 2004).

Se han utilizado catalizadores heterogéneos sólidos con diferentes grados de basicidad como hidrotalcitas, zeolitas, zeolitas intercambiadas, carbonato de calcio, óxidos de estaño,

estroncio, magnesio, zinc, etc. (Brito *et al.*, 2006, 2007, 2009; Díaz *et al.*, 2010). Esta catálisis sólo requiere la evaporación del metanol sin producción de efluentes residuales obteniéndose una glicerina pura sin contaminantes. Sin embargo, su elevado coste económico debido a la necesidad de emplear elevadas condiciones de temperatura y presión, así como grandes volúmenes de metanol, no permite todavía una aplicación comercial en la producción de biodiesel a nivel industrial. Los catalizadores heterogéneos, en ocasiones, se deben sintetizar asegurando que sus componentes cumplan con sus características físicas y químicas (Semwal *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011).

Entre los principales inconvenientes que presenta la utilización de este tipo de catalizadores se encuentra la desactivación de los mismos por envenenamiento (adsorción química de impurezas sobre los centros activos como H₂O y CO₂), ensuciamiento (degradación de productos y reactivos por impurezas que se depositan sobre el sólido o formación de coque) y sinterización (transformación estructural de la superficie catalítica debido a incrementos de temperatura locales o al medio reactivo con lo que el catalizador no puede ser regenerado).

1.8.4.2.1.3.2 Catalizadores enzimáticos

La catálisis enzimática se caracteriza porque los productos obtenidos son más puros, no se forman jabones, no se emplean catalizadores químicos que afectan el medio ambiente, se evita la neutralización ácida y la recuperación del catalizador es fácil. Los catalizadores enzimáticos, como las lipasas, son más fáciles de recuperar en el subproducto de la transesterificación que los catalizadores homogéneos, sin necesidad de utilizar procesos complejos, con la ventaja de que el elevado contenido de FFA en el aceite, principalmente de fritura, no es un problema, ya que las lipasas los transforman completamente en FAMES. Se pueden emplear lipasas intra- y extracelulares, siendo efectivas en las reacciones de transesterificación ya sea en medio acuoso o no acuoso. Estas lipasas son extraordinariamente selectivas, lo que permite que se lleve a cabo un proceso concreto evitando reacciones secundarias. Otra ventaja es que la conversión alcanzada es similar a la que se obtiene con procesos catalizados por ácidos o bases. Los valores de conversión empleando lipasas como catalizador varían entre el 60 y el 100 %, dependiendo del alcohol y aceite utilizado. Su mayor inconveniente es el coste de la producción de las enzimas, que es mucho mayor que el de los catalizadores homogéneos.

Las lipasas que se suelen emplear son *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus orizae*, *Candida antártica*, *Staphylococcus xylosus* y *Candida rugosa*, entre otras. Estas enzimas se utilizan en forma libre o inmovilizada durante la reacción de transesterificación. Las enzimas libres se agregan directamente al medio de reacción, pero debido al contacto directo con el alcohol, se reduce su actividad catalítica y se dificulta su recuperación al final del proceso. Las enzimas inmovilizadas son lipasas que se adhieren o confinan en partículas sólidas (soportes de inmovilización), con el propósito de mantener su

actividad catalítica y posibilitar su reutilización. Entre los soportes de inmovilización más utilizados se encuentran espumas de poliuretano reticulado, celitas, soportes de polipropileno y resinas de intercambio iónico (Guncheva *et al.*, 2011).

I.8.4.2.2 Transesterificación no catalítica

La transesterificación supercrítica no catalítica del aceite vegetal con metanol ofrece una nueva forma de producción de biodiesel. El estado supercrítico del metanol evita la separación natural de las fases aceite-metanol para formar una única fase, debido a una disminución de la constante dieléctrica del alcohol. La reacción de transesterificación en condiciones supercríticas se completa en minutos, mientras que la transesterificación convencional necesita un mayor tiempo para completarse, ya que en condiciones supercríticas la mezcla se convierte en una fase única y homogénea, acelerando la reacción, ya que no hay intercambio de masa en la interfase, que limita la velocidad de reacción. Otro efecto positivo del empleo de las condiciones supercríticas es que el propio alcohol no sólo es un reactivo, sino que además actúa como catalizador debido a las elevadas presiones y temperaturas alcanzadas durante el proceso. Este tipo de transesterificación ha alcanzado mucha popularidad en los últimos años -(Sawangkeaw *et al.*, 2010; Marulanda *et al.*, 2010).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Actualmente, no cabe duda de que la sustitución de los combustibles fósiles por biocombustibles presenta un elevado interés, ya que constituyen una fuente de energía renovable cuyo empleo permitiría disminuir nuestra dependencia de dichos combustibles. Por otro lado, el empleo de aceites vegetales de fritura como materia prima para la obtención de biocarburantes permitiría paliar, al menos en parte, el problema de recogida y eliminación de estos aceites. En este contexto, la presente Tesis Doctoral tiene como principal objetivo la obtención y caracterización de biodiesel obtenido a partir de aceites vegetales, tanto sin usar como procedentes de procesos de fritura, utilizando nuevas metodologías analíticas que faciliten el seguimiento del proceso y la calidad y estabilidad del biocombustible obtenido. Para ello, será necesario abordar los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de una nuevas metodologías analíticas para:

1. La determinación simultánea de FAMES en muestras de biodiesel mediante GC-FID de una forma rápida y sencilla.
2. La determinación de elementos metálicos y semimetálicos, en muestras de aceite y biodiesel, basada en la mineralización en horno de microondas y análisis mediante ICP-AES.
3. La incorporación de la técnica de espectrometría de masas por desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI-TOF MS) para la caracterización del aceite de partida y del biodiesel obtenido o para analizar el grado de conversión de la reacción.

- Optimización del proceso de obtención de biodiesel mediante reacción de transesterificación con catálisis homogénea alcalina, a partir de aceites vegetales sin usar y de fritura.

- Evaluación del comportamiento frente a la oxidación del biodiesel obtenido. Para ello, se estudiará la calidad del biocombustible obtenido, la influencia del tiempo de almacenamiento así como el empleo de antioxidantes como medio de conservación.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se presenta una relación de los reactivos, instrumentos y muestras de aceites vegetales, sin usar y de fritura, utilizados en el desarrollo de la presente Memoria. Asimismo, se describen los procedimientos experimentales empleados para la producción de biodiesel a partir de distintos tipos de aceites; el estudio de la composición en FAMES mediante GC-FID de las muestras de biodiesel producidas; la evaluación de la calidad de las muestras de aceite y biodiesel mediante la determinación de los principales parámetros físico-químicos correspondientes a los requisitos de calidad establecidos en la normativa europea UNE-EN 14214:2009; el estudio de la estabilidad de las muestras de biodiesel mediante el empleo de antioxidantes por GC-FID; la determinación del contenido de elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES y la caracterización de la composición mediante MALDI-TOF MS de las muestras de aceite y biodiesel estudiadas.

III.1 Reactivos y disoluciones

● Disoluciones patrón líquidas de metil caprato (metil decanoato), metil undecanoato (metil undecanoato), metil laurato (metil dodecanoato), metil miristato (metil tetradecanoato), metil palmitato (metil hexadecanoato), metil palmitoleato (metil cis-9-hexadecenoato), metil estearato (metil octadecanoato), metil oleato (metil cis-9-octadecenoato), metil linoleato (metil cis,cis-9,12-octadecadienoato), metil linolenato (metil cis-cis-cis-9,12,15-octadecatrienoato), metil araquidato (metil araquidato), metil eicosenoato (metil cis-11-eicosenoato), metil behenato (metil docosanoato), metil erucato (metil cis-13-docosenoato) de (10.000 ± 2) mg L⁻¹ y pureza > 99,0 %, suministrados por AccuStandard (New Haven, EE.UU.). Se prepararon disoluciones madre de cada uno de los FAMES a una concentración de 100 mg L⁻¹ mediante disolución con n-hexano (Scharlau, Barcelona, España) de los patrones analíticos y se conservaron en el frigorífico a 4 °C. A partir de la disolución madre, se prepararon diariamente las disoluciones de trabajo mediante diluciones apropiadas con n-hexano hasta la concentración final.

● Se empleó metanol, éter de petróleo y dietil-éter, suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), para activar los cartuchos de SPE y eluir la muestra de biodiesel retenida en los mismos.

● El catalizador empleado para la obtención del biodiesel (metóxido sódico) se preparó utilizando metanol (pureza > 99 %) e hidróxido sódico (pureza > 99 %), ambos suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El hidróxido sódico que no reaccionó en la reacción de transesterificación se eliminó con ácido fosfórico (pureza > 85 %), suministrado por Merck. Se empleó agua desionizada Milli-Q®, obtenida de un sistema Milli-Q Gradiente A10 (Millipore, Bedford, MA, USA) para la preparación de las correspondientes disoluciones. Las muestras de aceite procedentes de procesos de fritura se sometieron a un proceso de deshidratación con sulfato de magnesio anhidro, suministrado por Panreac (Barcelona, España).

● Los reactivos empleados para la caracterización de las muestras de aceite y biodiesel fueron los siguientes:

- **Índice de acidez**

- ◆ Éter dietílico estabilizado con 2,6-Di-terc-butil-4-metilfenol y etanol 95 %, suministrados por Scharlau (Barcelona, España), e hidróxido potásico en disolución etanólica 0,1 N obtenido de Panreac (Barcelona, España). Se empleó fenolftaleína al 1 % en etanol como indicador (Panreac, Barcelona, España).

- **Índice de yodo**

- ◆ Sulfato sódico anhidro y ácido acético glacial, de Panreac (Barcelona, España) y ciclohexano, reactivo de Wijs (solución de yoduro de cloro) 0,1 N, yoduro potásico y tiosulfato sódico 0,1 N suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

- **Índice de peróxidos**

- ♦ 1-decanol obtenido de Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), ácido acético glacial de Panreac (Barcelona, España) y yodo, yoduro potásico y tiosulfato sódico 0,01 N suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

- **Contenido en agua en biodiesel**

- ♦ Hydranal® Coulomat A y Coulomat C (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) para el anolito y el catolito, respectivamente. Se empleó Hydranal® Check Solution 0,1 (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) para comprobar, periódicamente, la fiabilidad del equipo.

- Los antioxidantes empleados en el estudio de estabilidad del biodiesel fueron 3-tert-butil-4-hidroxianisol (pureza > 99,2 %), 3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (pureza > 99,9 %), 2,4,5-trihidroxibutirofenona (pureza > 99,5 %), 2,6-di-tert-butil-4-(hidroximetil)fenol (pureza > 97,4 %), etoxiquin (pureza > 86,2 %), ácido nordihidroguaiarético (pureza > 96,9 %), tert-butil hidroquinona (pureza > 97,4 %), octil galato (pureza > 99,9 %), propil galato (pureza > 98,9 %) y dodecil galato (pureza > 99,3%), suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.).

- La determinación del contenido de Na, K, Ca, Mg y P por ICP-AES en matrices orgánicas, según las normas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003, se realizó empleando patrones de dichos metales en base orgánica de $(1.000 \pm 2) \text{ mg L}^{-1}$ e Y de 1.000 mg L^{-1} como patrón interno, todos suministrados por Conostan (SCP Science, Courtaboeuf, Francia). Los calibrados y las diluciones de las muestras se prepararon utilizando queroseno o xileno como disolventes (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y aceite base de 20 cSt o 75 cSt (Conostan). Las disoluciones patrón de trabajo se prepararon diariamente a partir de las anteriores mediante la dilución correspondiente.

- Los ácidos utilizados para realizar la digestión de las muestras de biodiesel y aceite fueron ácido nítrico de 69,5 % y ácido clorhídrico de 37 %, así como peróxido de hidrógeno de 35 %, suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

- La determinación de metales por ICP-AES se realizó empleando disoluciones patrón líquidas para ICP, TraceCERT® Ultra, de Al, Ca, Cd, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn de $(1.000 \pm 2) \text{ mg L}^{-1}$, de As de $(994 \pm 2) \text{ mg L}^{-1}$ y de Cu de $(998 \pm 4) \text{ mg L}^{-1}$, suministradas por Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y disoluciones patrón líquidas de Ba, Co, K, Mo, Na, P, S y V de $(1.000 \pm 2) \text{ mg L}^{-1}$ fueron suministradas por Scharlau (Barcelona, España). Las disoluciones patrón de trabajo se prepararon diariamente a partir de las anteriores, mediante la dilución adecuada en agua desionizada, obtenida mediante un sistema de purificación de agua modelo Elix® (Millipore, Molsheim, Francia), y en un medio de HNO_3 2 % (v/v). Se empleó una disolución patrón líquida de Y, de concentración 1.000 mg L^{-1} , como patrón interno para el análisis multielemental mediante ICP-AES.

● La caracterización de las muestras de aceite y biodiesel mediante MALDI-TOF-MS se realizó utilizando como matriz una disolución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) disuelto en acetona (Penta Industries Pvt Ltd., Karachi, Pakistan). También se empleó ácido trifluoroacético como parte de la matriz, de Fluka AG (Buchs, Suiza). La calibración de las masas de las especies generadas por el instrumento de MALDI se llevó a cabo empleando fósforo rojo (Riedel de Haën, Hannover, Alemania). Otros disolventes empleados fueron metanol y cloroformo, proporcionados por Penta Industries (Pvt) Ltd. (Karachi, Pakistán), y acetonitrilo, calidad LiChrosolv®, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua desionizada (doble destilada) empleada para la preparación de las disoluciones y el lavado del material fue obtenida mediante un sistema de purificación de agua suministrado por Heraeus Quartszschmelze (Hanau, Alemania).

III.2 Equipos e instrumentos

● Cromatógrafo de gases Varian 3900 (Varian Australia, Mulgrave, Australia) (Figura III.1), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un muestreador automático modelo CP-8410 (Varian). La adquisición, almacenamiento y procesado de los datos cromatográficos se realizaron a partir del software Varian Star Chromatography Workstation, versión 6.00. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna capilar CP-SIL 88 para el análisis de FAMES (WCOT Fused Silica, Varian), con una longitud total de 50 m, diámetro interno de 0,25 mm y espesor de película de 0,25 μm .



Figura III.1.- Cromatógrafo GC-FID.

● Horno de microondas modelo ETHOS 1 (Milestone S.r.l., Sorisole, BG, Italia) (Figura III.2), equipado con un sistema interno de control de temperatura automático tipo ATC-400-CE, un rotor segmentado de alta presión tipo HPR-1000/10S (condiciones de operación de presión y temperatura máximos: 100 Bar y 300 °C) y vasos para microondas de TFM.



Figura III.2.- Horno de microondas.

● Espectrómetro de emisión atómica “Liberty Series II Axial Sequential ICP-AES” (Varian, Mulgrave, Australia) (Figura III.3), equipado con un nebulizador tipo *V-groove*, una cámara de expansión cilíndrica de doble paso tipo *Sturman-Masters*, una antorcha tipo Fassel (13 cm) en disposición axial, una interfase consistente en un cono refrigerador de níquel, un sistema de recirculación de agua “Kühlmobil Typ 001 VD” (Van Der Heijden Labortechnik GmbH, Seelbach, Alemania), un generador de radiofrecuencia que operaba a una frecuencia de 40 MHz, un monocromador consistente en una red de difracción, y un detector consistente en un doble tubo fotomultiplicador que operaba a un potencial entre 650 y 750 V. La determinación de Na, K, Ca, Mg y P en matrices orgánicas requiere el empleo de un módulo auxiliar de oxígeno modelo AGM-1 (Varian, Mulgrave, Australia), Los datos obtenidos para el análisis multielemental fueron tratados empleando el software “Liberty ICP Expert” (Varian).



Figura III.3.- Espectrómetro ICP-AES.

● Espectrómetro de masas MALDI-TOF MS (Figura III.4), equipado con un detector de tiempo de vuelo AXIMA SHIMADZU CFR de Kratos Analytical (Manchester, Reino Unido) y un láser de nitrógeno de Laser Science Inc. (Franklin, MA, USA). El control del instrumento y la adquisición de los datos se realizaron mediante el software Kratos Kompact V5.2.0 y el software Launchpad 1.2.0, respectivamente.



Figura III.4.- Espectrómetro MALDI-TOF MS.

● Los instrumentos empleados para la caracterización de las muestras de aceite y biodiesel fueron los siguientes:

- **Densidad:**

- ◆ Criostato JULABO modelo FP 10-MV (JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Alemania), para mantener la temperatura de las muestras a 15 °C, densímetros de inmersión (Kessler Thermometer Corp., Nueva York, EE.UU.) de diferentes intervalos nominales de densidad, picnómetro de Gay-Lussac de 50,612 mL (Afora S.A., España) y densímetro digital Kyoto DA 300 (Kyoto Electronics Manufacturing CO., LTD. Japón) (Figura III.5).



Figura III.5.- Densímetro digital.

- **Viscosidad cinemática:**

- ◆ Viscosímetro rotacional VISCO STAR Plus modelo ST 2001 L (JP Selecta S.A., Barcelona, España) (Figura III.6), con un husillo LCP y camisa de circulación de agua para termostatización de las muestras, y ultratermostato de circulación de agua modelo ULTRATERM 200 (JP Selecta, S.A., Barcelona, España).



Figura III.6.- Viscosímetro rotacional.

- **Índice de acidez, índice de yodo e índice de peróxidos:**

- ♦ Valorador automático Titrino Basic 794 (Metrohm, Herisau, Suiza), equipado con un stand de valoración con agitador magnético TiStand 703 (Metrohm) y distintos tipos de electrodos indicadores (Figura III.7). El índice de acidez se determinó empleando un electrodo solvotrode, con cloruro de litio saturado en etanol como electrolito, mientras que el índice de yodo y el índice de peróxidos se determinaron empleando un electrodo de platino combinado.



Figura III.7.- Valorador automático.

- **Contenido en agua y materias volátiles en muestras de aceite:**

- ♦ Mufla eléctrica Heraeus Thermicon modelo M104 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, EE.UU.) y cápsulas de porcelana.

- **Contenido en agua en muestras de biodiesel:**

- ♦ Valorador coulombimétrico KF 831 equipado con un stand de valoración con agitador magnético TiStand 703 (Metrohm, Herisau, Suiza).

- **Curva de destilación e índice de cetano en muestras de biodiesel:**

- ♦ Destilador automático HDA modelo 627 HERZOG (PAC-Walter Herzog GmbH, Lauda-Königshofen, Alemania) (Figura III.8), equipado con un matraz de 100 mL y una probeta graduada de 100 mL, específicos para este equipo, y controlado por el software HLIS for Windows (PAC-Walter Herzog GmbH).



Figura III.8.- Destilador automático.

- **Punto de obstrucción de filtro en frío en muestras de biodiesel:**

- ♦ Analizador HCP modelo 842 (PAC-Walter Herzog GmbH, Lauda-Königshofen, Alemania), equipado con tubos de ensayo de vidrio con marca anular de nivel a los 45 mL específicos para este equipo y con un criostato JULABO modelo FP 88-MV (JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Alemania) para mantener la temperatura de la muestra a -52 °C. En la Figura III.9 se muestra el equipo empleado para la determinación del punto de obstrucción de filtro en frío.



Figura III.9.- Analizador del punto de obstrucción de filtro en frío.

- **Punto de inflamación en muestras de biodiesel:**

- ♦ Equipo de inflamabilidad MP modelo 329/330 (PAC-Walter Herzog GmbH, Lauda-Königshofen, Alemania), equipado con una cazoleta metálica para muestras específica para este equipo (Figura III.10).



Figura III.10.- Equipo de inflamabilidad.

- **Contenido en azufre en muestras de biodiesel:**

- ♦ Espectrómetro de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva Oxford modelo LAB-X-3000S (Oxford Instruments Austin Scientific, Texas, EE.UU.) (Figura III.11), equipado con una cápsula con anilla de plástico y una lámina de poliéster Poly-S Film Oxford, específicas para este equipo.



Figura III.11.- Espectrómetro de fluorescencia de rayos X, empleado para la determinación del contenido en azufre.

- **Contenido en cenizas sulfatadas en muestras de biodiesel:**

- ♦ Mufla eléctrica Heraeus Thermicon modelo M104 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, EE.UU.), capaz de mantener una temperatura de $(775 \pm 25) ^\circ\text{C}$, y placa calefactora modelo S-1000443 (JP Selecta, Barcelona, España). Además es necesario el empleo de un disco evaporador o crisol, de porcelana, sílice fundida o platino, de 50 a 100 mL para muestras que contengan más del 0,02 % en peso de cenizas sulfatadas o de 120-150 mL para las que contengan menos del 0,02 %.

- **Residuo carbonoso Conradson en muestras de biodiesel:**
 - ◆ Horno de coquización ALCOR modelo MCRT-130 (Petroleum Instruments Co., Inc., Oklahoma City, EE.UU.), equipado con viales de coquización específicos para este equipo.
- **Corrosión a la tira de cobre en muestras de biodiesel:**
 - ◆ Láminas del 99,9 % en cobre de 12,5 mm de anchura, 1,5 a 3 mm de espesor y 75 mm de longitud, pulidas con papel de arena y algodón, baño termostático modelo TBN-45-100 (Science Basic Solutions, S.L., Barcelona, España) y termómetro de inmersión ASTM 12C (Kessler Thermometer Corp., Nueva York, EE.UU.). Además es necesario el empleo de tubos de ensayo de 25 x 150 mm específicos para la determinación del índice de cobre, así como una placa de patrones de corrosión para determinar la pérdida de brillo al final del ensayo.
- **Estabilidad a la oxidación en muestras de biodiesel:**
 - ◆ Conductímetro CRISON modelo GLP 31 (Crison Instruments, S.A, Barcelona, España), equipado con un electrodo de conductividad, baño termostático DIGIBATH-2 modelo BOD-2 (Raypa Espinar, S.L., Barcelona, España) y controlador de caudal másico de gas (efecto térmico) MAFC BRONKHORST modelo HI-TEC 300 (Bronkhorst High-Tech, NL-7261 AK Ruurlo, Holanda). En la Figura III.12 se muestra el equipo empleado para la determinación de la estabilidad oxidativa.



Figura III.12.- Equipo de estabilidad oxidativa.

- Otros equipos y materiales empleados en la presente Tesis Doctoral fueron:
 - Reactor de vidrio cilíndrico de 1.000 mL de capacidad y tapa de 4 bocas, de Scharlab (Barcelona, España).
 - Motor Stuart Stirrer SS10 (Londres, Reino Unido).
 - Baño termostático J.P Selecta (Barcelona, España).
 - Condensador de vidrio, de Afora (Barcelona, España).
 - Centrifugadora-evaporadora JOUAN RC1010 con condensador RCT90 (Jouan, Saint-Herblain, Francia).
 - Micropipetas "Pluripet Kartell" de 20-200 μ L y de 100-1000 μ L Scharlab (Barcelona, España).

- Balanza de precisión Sartorius CP224S (Goettingen, Alemania) y balanza analítica “Qualitty 125 A” de Precisa (Dietikon, Suiza).
- Rotavapor R-200 con baño termostático B-490, bomba de vacío V-500 y controlador de vacío V-800 (Büchi, Labortechnik AG, Flawil, Suiza).
- Cartuchos Oasis[®] HLB de 6 cm³ y 500 mg y sistema de vacío Vac-Master IST (Waters, Milford, EE.UU.) para la extracción con cartuchos de SPE.
- Dispositivo de extracción manual para la SPME y fibras de SPME con recubrimiento de PA (85 µm), de PDMS (100 µm) y de PDMS/DVB (60 µm), de Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.).

III.3 Muestras de aceite

Las muestras de aceite empleadas en la presente Memoria han sido:

- Aceites vegetales de maíz, oliva, girasol, colza, semillas y soja-girasol sin usar, adquiridas en distintos comercios locales.
- Aceites vegetales de maíz, oliva, girasol, colza, semillas y soja-girasol procedentes de procesos de fritura de cocinas particulares de la isla de Tenerife.
- Aceites de fritura de distinta composición (oliva-girasol y oliva-girasol-maíz), procedentes de la cafetería de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna y de comedores escolares de la isla de Tenerife.

III.4 Procedimiento experimental

III.4.1 Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) por GC-FID

Separación cromatográfica

La separación cromatográfica mediante GC se llevó a cabo utilizando un detector FID, siendo la temperatura del detector y del inyector de 250 °C. El gas portador empleado fue helio, a un caudal de 1,0 mL min⁻¹, y como gas auxiliar o “make up” se utilizó nitrógeno, a un caudal de 30,0 mL min⁻¹. La inyección de muestra se realizó en modo *split*, con una relación 1:20, con un volumen de inyección de muestra de 0,1 µL y una presión en cabeza de columna de 28,1 psi. En cuanto al sistema de detección, se utilizó un caudal de aire y de hidrógeno de 400 y 30 mL min⁻¹, respectivamente. El programa de temperatura del horno de la columna se recoge en la Tabla III.1.

Tabla III.1.- Programa de temperatura aplicado para la separación cromatográfica (tiempo total de análisis: 19,25 minutos).

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C min ⁻¹)	Tiempo de mantenimiento (min)
1	160	-	1
2	170	8	5
3	200	30	5
4	210	10	5

Método de limpieza de muestra mediante SPE

A) El cartucho Oasis HLB se activó haciendo pasar lentamente 15 mL de metanol y 10 mL de agua Milli-Q. Seguidamente, se pasó por el mismo 1 mL de muestra y 10 µL de patrón interno. Después de pasar la muestra por el cartucho de SPE, éste se secó a vacío ($P = -5$ mmHg) durante 25 minutos. La muestra retenida se eluyó con 15 mL de una mezcla de éter de petróleo y dietil-éter (9:1, v/v). Posteriormente, el disolvente orgánico se evaporó hasta casi sequedad a 40 °C. El residuo obtenido se redisolvió en n-hexano y se enrasó a 25 mL.

B) El cartucho Sep-Pak-Plus se activó haciendo pasar lentamente 10 mL de una mezcla de éter de petróleo y dietil-éter (9:1, v/v) y 10 mL de n-hexano. A continuación, se pasó por el mismo 1 mL de muestra y 10 µL de patrón interno. Después de pasar la muestra por el cartucho de SPE, éste se secó a vacío ($P = -5$ mmHg) durante 10 minutos. La muestra retenida se eluyó con 20 mL de una mezcla de éter de petróleo y dietil-éter (9:1, v/v). Posteriormente, el disolvente orgánico se evaporó hasta casi sequedad a 40 °C. El residuo obtenido se redisolvió en n-hexano y se enrasó a 25 mL.

Método de limpieza de muestra mediante SPME

Un volumen de muestra de 1 mL se colocó en un vial de vidrio de 16 mL, con una barra agitadora, junto con 4 mL de n-hexano y 10 µL de patrón interno. Las fibras de PDMS/DVB, PDMS y PA, previamente activadas con metanol durante 30 minutos y agitación constante a 300 rpm, se introdujeron directamente en el vial que contiene la muestra, en modo *direct immersion (DI-SPME)*, de forma que la extracción se llevó a cabo a una temperatura de 20 °C durante 160 minutos y con agitación constante a 800 rpm. A continuación, se llevó a cabo la etapa de desorción de la muestra retenida en la fibra, con 1,5 mL de n-hexano durante 16 minutos y agitación de 1.000 rpm. Posteriormente, el disolvente orgánico se evaporó a casi sequedad a 40 °C. El residuo obtenido se redisolvió en 1,7 mL de n-hexano. Después de cada extracción y antes de su próximo uso, las fibras se lavaron con metanol durante 20 minutos a 300 rpm.

Estabilidad de los FAMES estudiados durante el análisis mediante GC-FID: Validación del método analítico desarrollado

La exactitud del método analítico desarrollado para la determinación de FAMES mediante GC-FID se evaluó mediante un estudio de recuperación de los trece FAMES estudiados, el cual se realizó mediante la adición de cantidades conocidas y diferentes de cada uno de los patrones de FAMES a la muestra de biodiesel de aceite de girasol sin usar. El enriquecimiento se realizó al doble de la concentración de cada FAME encontrado en esta muestra de biodiesel. Para ello, se añadieron, por triplicado, 500 μL de una disolución patrón que contenía distintas concentraciones de los trece FAMES estudiados sobre a 0,5 g de la muestra de biodiesel. Las muestras enriquecidas se sometieron al método de determinación de FAMES mediante GC-FID, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. En la Tabla III.2 se muestran las concentraciones de los trece FAMES estudiados contenidos en la disolución patrón añadida a la muestra de biodiesel.

Tabla III.2.- Concentraciones de los trece FAMES estudiados contenidos en la disolución patrón añadida a la muestra de biodiesel.

Pico	FAMES	Concentración de la disolución patrón añadida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	C10:0	20
2	C12:0	20
3	C14:0	20
4	C16:0	80
5	C16:1	20
6	C18:0	20
7	C18:1	300
8	C18:2	750
9	C18:3	20
10	C20:0	20
11	C20:1	20
12	C22:0	20
13	C22:1	20

III.4.2 Producción de biodiesel mediante catálisis homogénea alcalina

El biodiesel utilizado en todas las experiencias fue obtenido mediante una reacción de transesterificación con catálisis homogénea alcalina a partir de muestras de aceite, a presión atmosférica y a una temperatura de 65 $^{\circ}\text{C}$, utilizando un reactor discontinuo provisto de una camisa para la recirculación del agua, que permite la termostatación del proceso, y un refrigerador de agua, que evita las pérdidas de metanol por evaporación. Se pesaron con precisión 600,2 g de muestra de aceite y se colocaron en el reactor de vidrio termostatizado. El catalizador de la reacción estaba formado por una disolución de metóxido sódico preparada

mediante la mezcla de 168 mL de metanol y 6 g de hidróxido sódico. Esta disolución se preparaba diariamente, para preservar la actividad catalítica y evitar la absorción de humedad.

Las muestras de aceite se agitaron y calentaron a 65 °C en un baño termostatzado, con objeto de poder mantener la temperatura constante durante la reacción. Una vez alcanzada dicha temperatura, se añadió el catalizador al reactor. La mezcla fue mantenida a 65 °C durante toda la reacción y agitada continuamente a 700 rpm durante un tiempo de reacción de 80 minutos. En la Figura III.13 se muestra el reactor discontinuo empleado para la obtención del biodiesel mediante la reacción de transesterificación.



Figura III.13.- Reactor discontinuo empleado para la obtención del biodiesel.

El producto de la reacción se colocó en un embudo de decantación durante 24 horas para permitir la separación de las dos fases formadas. La fase superior contiene el biodiesel obtenido, junto con el aceite que no ha reaccionado, el exceso de metanol y catalizador y pequeñas cantidades de jabón producidas durante el proceso, mientras que la fase inferior contiene la glicerina formada durante el proceso.

El exceso de catalizador presente en la fase superior se eliminó mediante sucesivos lavados con 25 mL de una disolución de ácido fosfórico al 5 % (v/v), hasta que las aguas de lavado obtenidas fueran limpias y claras. El exceso de metanol y los restos de agua se eliminaron mediante evaporación a vacío en un evaporador centrífugo a 80 °C, durante un tiempo de 2 horas. El producto final obtenido (biodiesel) es un líquido de color amarillo pálido.

III.4.3 Caracterización de las muestras de aceite y biodiesel mediante la norma UNE-EN 14214:2009

Se comentan a continuación los diferentes procedimientos empleados para caracterizar las muestras de aceite y biodiesel.

Densidad (kg m^{-3})

La determinación de la densidad se llevó a cabo mediante tres métodos:

A) Densímetro de inmersión. Se aplicaron las normas EN ISO 3675 y/o EN ISO 12185, según las cuales las medidas deben efectuarse a 15°C . Se utilizó un densímetro de rango $800\text{--}900 \text{ kg m}^{-3}$ para la caracterización de las muestras de biodiesel y de rango $850\text{--}950 \text{ kg m}^{-3}$ para la caracterización de las muestras de aceite. Se preparó un baño termostatzado a 15°C y se sumergió en él un tubo de vidrio que contenía la muestra a analizar. Transcurridos 15 minutos, se introdujo el densímetro adecuado según la muestra y se dejó que se estabilizara lentamente en el líquido. Finalmente, se procedió a hacer la lectura del valor de densidad. Después de registrar la lectura, se extrajo el densímetro del líquido y se insertó un termómetro, agitando verticalmente con una varilla para medir la temperatura de la muestra. Si la temperatura difería de la lectura previa en más de $0,5^\circ\text{C}$, era necesario repetir el experimento. La temperatura debe controlarse exactamente, ya que la densidad de las materias grasas varía, aproximadamente, $0,68 \text{ kg m}^{-3}$ por grado (PQSA, 1999). El resultado se expresa como el valor medio de tres determinaciones de la densidad.

B) Picnómetro. Se limpió y secó perfectamente el picnómetro y se realizó la primera medición de masa, en una balanza de precisión, la cual se denota por M_1 . Se sumergió el picnómetro lleno con agua destilada, que es el líquido de referencia, hasta el enrase, en un baño termostatzado a 15°C . Transcurridos 15 minutos, se volvió a pesar el picnómetro con el agua (M_2). Finalmente, se llenó el picnómetro con la muestra hasta el enrase y se sumergió en el baño termostatzado, esperando de nuevo 15 minutos. En caso necesario se añadía más muestra para que el volumen contenido en el picnómetro fuera exactamente $50,612 \text{ mL}$. Se pesó el picnómetro con la muestra (M_3). En ambos casos se llenó el picnómetro hasta el enrase, evitando la presencia de burbujas en el interior del mismo. Para determinar la densidad de la muestra se utiliza la siguiente expresión (la densidad del agua es $999,103 \text{ kg m}^{-3}$):

$$\rho = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \cdot \rho_{\text{agua}}$$

El resultado se expresa como el valor medio de tres determinaciones de la densidad.

C) Densímetro digital. El instrumento está provisto de un carrusel portaviales que permite la determinación de la densidad en 24 muestras, por lo que sólo es necesario colocar la muestra en un vial y éste en la posición adecuada del carrusel. La medida de densidad ocurre de forma completamente automática, puesto que el equipo controla y optimiza el muestreo, el ajuste de temperatura, la medición, el drenaje, el lavado con dos disolventes distintos (n-heptano y nafta) y el secado de la célula de medida, dependiendo de las características de la muestra. Además, el muestreo automático evita la formación de burbujas de aire, tan habituales en las muestras viscosas, por lo que permite llevar a cabo medidas repetitivas. El modo de operación consistió en comprobar que la temperatura de la sonda de

temperatura es $15 \pm 0,05$ °C y que la densidad del aire es $0,0012$ g cm⁻³. El equipo proporciona el valor de la densidad como el valor medio de tres determinaciones.

Viscosidad cinemática (cSt)

Se empleó la norma UNE-EN ISO 3104:1999, según la cual el valor de viscosidad cinemática debe referirse a una temperatura de 40 °C. Para poder calcular la viscosidad cinemática (ν), fue necesario determinar previamente la viscosidad dinámica (μ), ya que ambas se relacionan con la densidad la muestra (ρ) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\nu \text{ (cSt)} = \frac{\mu \text{ (cP)}}{\rho \text{ (g} \cdot \text{cm}^{-3}\text{)}}$$

En un baño termostatzado a 40 °C, se introdujo la muestra dentro de la camisa del viscosímetro y se seleccionó el programa de medida de la viscosidad para un husillo LCP. La viscosidad dinámica de las muestras de aceite y biodiesel se determinó aplicando una velocidad de giro de 20 y 100 rpm, respectivamente. Una vez estabilizado el sistema, se hizo la lectura del valor de la viscosidad dinámica (μ), y a continuación, aplicando la expresión anterior, se calculó la viscosidad cinemática (ν), la cual se expresa como el valor medio de tres determinaciones.

Índice de acidez (mg KOH g muestra⁻¹)

Para poder determinar la acidez de las muestras hay que tener en cuenta que, en función del grado de acidez previsto, se deberá pesar una cierta cantidad de muestra (Tabla III.3). Para las muestras estudiadas se prevé un grado de acidez inferior al 1 %.

Tabla III.3.- Cantidad de muestra a pesar en función del grado de acidez previsto.

Grado de acidez previsto (% ácido oleico)	Peso de muestra (g)	Precisión de la pesada (g)
<1	20	0,05
1 a 4	10	0,02
4 a 15	2,5	0,01
15 a 75	0,5	0,001
>75	0,1	0,0002

Se pesaron en un vaso de precipitados 20 g de muestra, previamente filtrada, con una precisión de $\pm 0,05$ g, y se disolvieron en 100 mL de una mezcla de etanol al 95 % (v/v) y éter dietílico estabilizado con 2,6-Di-terc-butyl-4-metilfenol, en una proporción 1:1. Se agitó hasta conseguir la disolución de la muestra y a continuación se añadieron unas gotas de fenolftaleína al 1 % en etanol. Se empleó hidróxido potásico en disolución etanólica 0,1 N como reactivo valorante. Durante la valoración, la muestra se agitó con un agitador magnético hasta alcanzar el punto final de la valoración, proporcionado por el valorador automático, aunque éste también puede apreciarse visualmente gracias al viraje del indicador (color rosa). Las muestras de aceite de fritura se sometieron a una etapa previa de deshidratación con sulfato magnésico

anhidro y posteriormente se filtraron a vacío, con objeto de eliminar cualquier materia en suspensión y los restos de sulfato magnésico. Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras estudiadas.

Índice de yodo (g I_2 [100 g muestra] $^{-1}$)

Inicialmente, se deshidrató la muestra homogeneizada con sulfato sódico anhidro y a continuación se filtró. Después, se pesó la muestra en un vidrio de reloj en función del índice de yodo previsto, siguiendo los valores de la Tabla III.4. Para las muestras estudiadas se prevé un índice de yodo comprendido entre 51 y 100 g I_2 [100 g muestra] $^{-1}$.

Tabla III.4.- Cantidad de muestra a pesar en función del índice de yodo previsto.

Índice de yodo previsto (g I_2 [100 g muestra] $^{-1}$)	Peso de muestra (g)
<5	3,00
5 a 20	1,00
21 a 50	0,40
51 a 100	0,20
101 a 150	0,13
151 a 200	0,10

Se pesaron 0,20 g de muestra, se introdujeron en un matraz erlenmeyer de 500 mL y se disolvieron con 20 mL de una mezcla de ciclohexano y ácido acético glacial, en una proporción 1:1 (v/v). Una vez disuelta, se agregaron 25 mL de reactivo de Wijs 0,1 N (disolución de yoduro de cloro), agitando el contenido del matraz y dejándolo posteriormente en la oscuridad durante una hora. Se preparó del mismo modo un ensayo en blanco. Una vez transcurrido dicho tiempo, se añadieron 20 mL de una disolución de yoduro potásico al 10 % y 150 mL de agua destilada. Finalmente, se valoró el yodo liberado de las muestras mediante potenciometría, utilizando tiosulfato sódico 0,1 N como reactivo valorante. Durante la valoración, la muestra se agitó con un agitador magnético hasta alcanzar el punto final de la misma. Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras estudiadas.

Índice de peróxidos (meq O_2 kg muestra^{-1})

Se pesaron 5,00 g ($\pm 0,05 \text{ g}$) de muestra en un matraz erlenmeyer de 500 mL y se disolvieron con 10 mL de una mezcla de ácido acético glacial y 1-decanol, en una proporción 3:2 (v/v), que además debe contener entre 20 y 30 mg L^{-1} de yodo. A continuación, se añadieron 200 μL de una disolución saturada de yoduro potásico, se agitó la mezcla obtenida y se dejó reposar durante 1 minuto en la oscuridad. Se trasvasa la muestra a un vaso de precipitados y se añadieron 50 mL de agua destilada. Se preparó del mismo modo un ensayo en blanco. Finalmente, se valoró el yodo liberado de las muestras mediante potenciometría, utilizando tiosulfato sódico 0,01 N como reactivo valorante. Durante la valoración, la muestra

se agitó con un agitador magnético hasta alcanzar el punto final de la valoración. Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras estudiadas.

Contenido en agua y materias volátiles en muestras de aceite (% Humedad-MV)

La determinación del contenido de humedad y de materias volátiles se realizó de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 662:2001. La muestra de aceite se homogeneizó mediante agitación, se pesó una cantidad de muestra entre 5,0 y 10,0 g ($\pm 0,001$ g) de muestra en un vaso de precipitados y se secaron en estufa a (103 ± 2) °C durante una hora. A continuación, se realizó la pesada con una aproximación de $\pm 0,001$ g, y se repitió este procedimiento, con periodos de secado en estufa de 30 minutos, hasta que la diferencia de masa entre dos pesadas consecutivas no superó los 2-4 mg. Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras estudiadas.

El porcentaje de humedad y de materias volátiles se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ humedad y materia volátil} = \frac{P_a - P_f}{M} \cdot 100$$

donde:

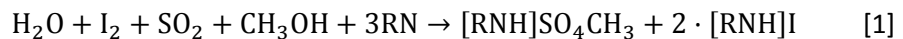
P_a = masa inicial, en g, del vaso de precipitados con la muestra de aceite

P_f = masa final, en g, del vaso de precipitados con la muestra de aceite

M = masa, en g, de la muestra

Contenido en agua en muestras de biodiesel ($mg H_2O L^{-1}$)

La determinación del contenido en agua se realizó de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 12937:2008, basada en el método de Karl Fischer por valoración coulombimétrica. Según dicho método, el agua reacciona con yodo (I_2) y dióxido de azufre (SO_2) en presencia de metanol (CH_3OH) y una base (RN).



En la reacción volumétrica, el yodo se añade como reactivo valorante, mientras que en la valoración coulombimétrica, el yodo es generado electrolíticamente por un anolito que lo contiene.



Mientras haya agua en la celda de valoración, el yodo generado reaccionará de acuerdo con la reacción [1]. Tan pronto como toda el agua se haya consumido, se producirá un pequeño exceso de yodo en el anolito. El electrodo doble de platino detectará este exceso de yodo y la generación de yodo se detendrá. De acuerdo con la ley de Faraday, la cantidad de

yodo generada es proporcional a la corriente que ha pasado. La estequiometría de la reacción [1] es 1:1, por lo que un mol de agua (18 g) corresponde, por tanto, a 2×96.487 culombios. En otras palabras, se consumirá una cantidad de electricidad de 10,72 culombios por mg de agua. De esta forma, el consumo total de electricidad proporcionará el contenido en agua presente en las muestras de biodiesel.

La muestra de biodiesel se recogió con una jeringa de vidrio perfectamente seca y se pesó. A continuación, se inyectó en el equipo valorador y se pesó la jeringa, para conocer por diferencia el peso exacto de muestra analizada. Este valor se introdujo en el equipo, que mediante la valoración determina el contenido en agua de la muestra. Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras estudiadas.

Volatilidad y curva de destilación en muestras de biodiesel

La determinación de la curva de destilación se realizó de acuerdo con la norma ASTM D1160-06. Se filtraron 100 mL de la muestra de biodiesel y se vertieron en un matraz de destilación, añadiendo unos trocitos de porcelana porosa, hirviendo así la muestra normalmente al alcanzarse la temperatura de ebullición, evitando salpicaduras en el interior del matraz.

Se fijó el sensor de temperatura (termopar), de forma que llegara hasta la salida de vapores del matraz, y se acopló el tubo de condensación del matraz de destilación al tubo de vapor del analizador. Se colocó el matraz en la placa calefactora y la probeta graduada en la cámara de destilado. El *software* del equipo realiza automáticamente la corrección de las temperaturas de ebullición obtenidas a su valor equivalente a la presión atmosférica normal. Se realizaron dos determinaciones para cada una de las muestras estudiadas.

Índice de cetano en muestras de biodiesel

El procedimiento normalizado para el cálculo del número de cetano en un motor CFR (ASTM D613-08; UNE-EN ISO 5165:1999) es muy costoso y complejo. El motor utilizado es muy sensible al tipo de muestra, y los valores obtenidos al emplear biocombustibles no serían fiables, ya que el motor no está diseñado para ellos, por lo que se han desarrollado otros métodos alternativos que permiten estimar el índice de cetano de un biodiesel a partir de sus características físicas o de su estructura química. De esta forma, es frecuente el empleo de expresiones matemáticas que correlacionan la facilidad de ignición con otras propiedades físico-químicas o la estructura química del combustible, a partir de las que se determina el índice de cetano calculado (ICC), como se muestra en las normas ASTM D976-06 y ASTM D4737-09a. Las diferencias entre los números de cetano medidos y los índices de cetano calculados según la fórmula de la norma ASTM D4737-09a son relativamente pequeñas en un amplio rango de índices de cetano comprendidos entre 40 y 55.

El cálculo del ICC se realizó mediante la ecuación de la norma ASTM D4737-09a, que procede de la estimación del número de cetano a partir de la destilación de la muestra, las temperaturas de cortes medidas y la densidad de la misma, obtenida mediante mínimos cuadrados. Dicha ecuación es la siguiente:

$$\text{ICC} = 45,2 + 0,0892 T_{10N} + (0,131 + 0,901B)T_{50N} + (0,0523 - 0,420B)T_{90N} + 0,00049(T_{10N}^2 - T_{90N}^2) + 107B + 60B^2$$

donde:

ICC = índice de cetano calculado

D = densidad a 15 °C, determinada según la norma ASTM D1298-99

DN = D - 0,85

B = [e^{(-3,5)(DN)}] - 1

T₁₀ = temperatura, en °C, al 10 % recuperado en destilación

T_{10N} = T₁₀ - 215

T₅₀ = temperatura, en °C, al 50 % recuperado en destilación

T_{50N} = T₅₀ - 260

T₉₀ = temperatura, en °C, al 90 % recuperado en destilación

T_{90N} = T₉₀ - 310

El procedimiento empleado para la realización de la destilación del biodiesel para obtener los puntos de destilado correspondientes al 10, 50 y 90 % (T₁₀, T₅₀ y T₉₀) fue el establecido en la norma ASTM D86-09, a presión atmosférica. La forma de operación fue la misma que la empleada para la determinación de las curvas de destilación. Una vez obtenidos los puntos de destilado correspondientes y la densidad de las muestras de biodiesel, se utilizó el *software CAL PETRO* para obtener los índices de cetano de las muestras. La determinación de los diferentes puntos del destilado se realizó por duplicado para cada una de las muestras estudiadas.

Punto de obstrucción de filtro en frío en muestras de biodiesel

La determinación del punto de obstrucción de filtro en frío (POFF) se realizó de acuerdo con las normas ASTM D6371-05 y UNE-EN 116:1998. Previamente es necesario filtrar la muestra de biodiesel con papel de filtro de (5 ± 1) µm sobre el tubo de ensayo (45 mL), así como comprobar que el sistema de refrigeración se encuentre aproximadamente a -52 °C y limpiar todo el sistema con nafta de limpieza.

Se colocó el tubo de ensayo con la muestra en el interior del equipo y se bajó el cabezal de medida, introduciéndolo en el tubo de ensayo. El equipo enfría la muestra a intervalos de 1 °C por debajo de su temperatura inicial, aspirándola con la bureta a vacío

controlado. Se midió el tiempo necesario para llenar el volumen de la bureta a través del elemento filtrante y se comprobó si el biodiesel, aspirado a través del filtro, retorna completamente al tubo de ensayo. El equipo repite esta operación hasta que el tiempo necesario para llenar el bulbo de la pipeta sea mayor de 60 segundos o no todo el biodiesel aspirado a través del filtro retorne al tubo de ensayo, antes de que la temperatura de la muestra se haya enfriado un 1 °C más, terminando el ensayo automáticamente. La lectura obtenida indica el POFF de la muestra de biodiesel. La determinación del POFF se realizó por duplicado para cada una de las muestras de biodiesel estudiadas.

Punto de inflamación o ignición en muestras de biodiesel

El procedimiento empleado para la determinación del punto de inflamación del biodiesel fue el establecido en la norma UNE-EN ISO 2719:2003. Se llenó la cazoleta con una alícuota de la muestra hasta el nivel indicado en la misma. En la pantalla del equipo apareció un mensaje indicando la temperatura a la cual se espera que se produzca el punto de inflamación. Si se desconoce el mismo, se realiza un pre-test y, a continuación, un segundo ensayo, introduciendo el valor obtenido en el pre-test como punto de inflamación esperado. Seguidamente, se encendió una llama piloto y comenzó una agitación uniforme de la muestra entre 90 y 120 rpm. La muestra de biodiesel se sometió a un calentamiento gradual, incrementando su temperatura a razón de 5 a 6 °C min⁻¹ hasta el final del ensayo.

La temperatura de inflamación mínima de la muestra, en vaso cerrado Pensky-Martens, es la que marca la sonda de temperatura en el momento en el cual, interrumpida momentáneamente la agitación, la mezcla de vapores de biodiesel/aire se inflama al ponerse en contacto con la llama piloto, después de efectuar su corrección a la presión atmosférica normal. La determinación se realiza por duplicado.

Contenido en azufre en muestras de biodiesel

La determinación del contenido de azufre en las muestras de biodiesel se realizó de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 20884:2004. La muestra se expuso en una cápsula de plástico, cubierta con una lámina de poliéster, a la radiación primaria de un tubo de rayos X. Se midieron las proporciones calculadas de la fluorescencia de rayos X del azufre K_α y la proporción calculada de la radiación base. El espectrómetro se optimizó utilizando una disolución de calibración con 50 µg g⁻¹ de azufre, con objeto de obtener la relación señal-ruido óptima. El contenido de azufre de la muestra se determinó a partir de una curva de calibración que ha sido previamente establecida, obteniendo la concentración de azufre en masa como el valor promedio de tres determinaciones.

Contenido en cenizas sulfatadas en muestras de biodiesel

El procedimiento empleado para la determinación del contenido en cenizas sulfatadas en muestras de biodiesel fue el establecido en la norma ASTM D874-07.

Inicialmente, se calentó un crisol de porcelana a (775 ± 25) °C durante al menos 10 minutos, para eliminar los restos de agua. Una vez enfriado en un desecador sin agente desecante, se pesó con una aproximación de $\pm 0,01$ mg. Se repitió este procedimiento hasta obtener una pesada constante del crisol. La cantidad de muestra de biodiesel en el crisol viene dada por la siguiente expresión:

$$P = \frac{10}{a}$$

donde:

P = masa, en g, de la muestra

a = cenizas sulfatadas esperadas, en %

La cantidad de muestra no debe ser superior a 100 g. Si la cantidad de cenizas sulfatadas difiere de la esperada en un factor superior a 2, es necesario repetir el análisis con otro peso de muestra calculado a partir del primer análisis.

A continuación, se calentó la muestra lentamente en una placa calefactora hasta que el contenido ardió con llama suave, para evitar pérdidas de muestra por salpicaduras o formación de espumas, manteniendo la temperatura para que la muestra continuara ardiendo uniforme y moderadamente. Cuando el proceso de combustión de la muestra finalizó, se siguió calentando suavemente hasta la desaparición de los gases. Seguidamente, el residuo se calcinó en una mufla a (775 ± 25) °C durante una hora, hasta la desaparición del material carbonoso (depósito negro). Una vez frío, se añadieron 3 gotas de agua y 10 de ácido sulfúrico concentrado y la mezcla se calentó en una placa calefactora hasta la finalización del desprendimiento de gases, volviendo a calcinar el residuo obtenido en la mufla durante una hora, pesando el crisol una vez frío. Este procedimiento se repitió hasta obtener una diferencia entre dos pesadas consecutivas inferior a 1 mg. El resultado se expresa como el porcentaje en peso de las cenizas sulfatadas en la muestra según la siguiente expresión:

$$\text{Contenido en cenizas (\% en peso)} = \frac{\text{masa cenizas}}{\text{masa muestra}} = \left(\frac{C - A}{B - A} \right) \cdot 100$$

donde:

A = masa, en mg, del crisol

B = masa, en mg, del crisol con la muestra de biodiesel

C = masa, en mg, del crisol con las cenizas

La determinación del contenido en cenizas sulfatadas se realizó por duplicado.

Residuo carbonoso Conradson en muestras de biodiesel

La determinación del residuo carbonoso Conradson de las muestras de biodiesel se realizó de acuerdo con las normas ASTM D4530-07 y UNE-EN ISO 10370:1996. La cantidad de muestra que es necesario pesar depende de la cantidad esperada de residuo carbonoso y de la apariencia de la muestra, según se muestra en la Tabla III.5.

Tabla III.5.- Cantidad de muestra para la determinación del residuo carbonoso.

Descripción de la muestra de biodiesel	Contenido previsto de residuo carbonoso (% m/m)	Peso de muestra (g)
Negra, viscosa o sólida	> 5,0	0,15 ± 0,05
Marrón o negra, opaca y poco viscosa	1,0 a 5,0	0,50 ± 0,10
Transparente o translúcida	< 1,0	1,50 ± 0,50

Se colocó el vial de vidrio con la muestra en el horno a una temperatura inferior a 100 °C. Fue necesario purgar el equipo con nitrógeno durante 10 minutos, a razón de 600 mL min⁻¹, reduciendo después el caudal a 150 mL min⁻¹ y calentando el horno lentamente hasta 500 °C, a una velocidad de 10-15 °C min⁻¹. La temperatura del horno se mantuvo a (500 ± 2) °C durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se dejó enfriar manteniendo una corriente de nitrógeno de 600 mL min⁻¹. Cuando la temperatura fue inferior a 200 °C, se retiró el vial, y una vez frío, se pesó con una aproximación de ± 0,01 mg. El resultado se expresa como el porcentaje en peso del residuo carbonoso en la muestra según la siguiente expresión:

$$\text{Residuo carbonoso (\% en peso)} = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \cdot 100$$

donde:

m_1 = masa, en g, del vial vacío

m_2 = masa, en g, del vial con la muestra analizada

m_3 = masa, en g, del vial con el residuo

La determinación del residuo carbonoso en las muestras de biodiesel se realizó por duplicado.

Corrosión a la tira de cobre en muestras de biodiesel

El procedimiento empleado para la determinación de la corrosión a la tira de cobre en muestras de biodiesel fue el establecido en la norma UNE-EN ISO 2160:1999. Inicialmente, se acondicionó la placa de cobre, eliminando sus posibles defectos y manchas con papel de arena. A continuación, la lámina de cobre se sumergió en iso-octano, se pulió con una hoja de tela abrasiva y se introdujo inmediatamente en el tubo de ensayo que contenía la muestra de biodiesel, cubriendo totalmente la placa de cobre. Posteriormente, el tubo con la muestra y la placa se sumergió en un baño termostático a (50 ± 1) °C durante 3 horas. Fue necesario

proteger el contenido del tubo de la exposición directa a la luz durante la realización del ensayo. Una vez finalizado, se extrajo la lámina de cobre del tubo de ensayo, se sumergió en iso-octano, se secó con papel de filtro y se examinó cuidadosamente, comprobando si se observaba pérdida de brillo o corrosión al compararla con la placa de cobre patrón de corrosión. Se determinó la clasificación de la corrosión de acuerdo con uno de los números listados en la placa patrón, indicando la temperatura y duración del ensayo. En la Figura III.14 se muestra la placa de patrones de corrosión empleada para determinar la corrosión a la tira de cobre.

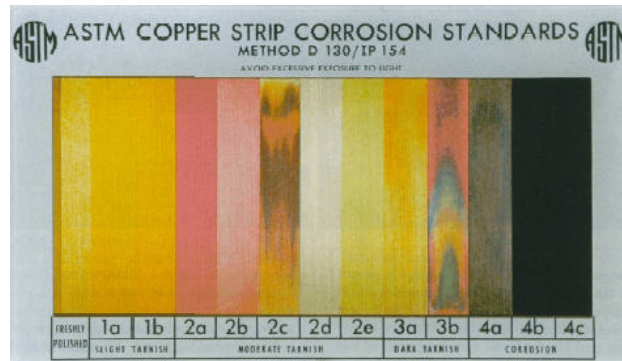


Figura III.14.- Placa de patrones de corrosión.

Estabilidad a la oxidación en muestras de biodiesel

En la norma UNE-EN ISO 14112:2003 se establece la determinación de la estabilidad a la oxidación de las muestras de biodiesel (ensayo de oxidación acelerada). En junio de 2009, se publicó la norma UNE-EN ISO 15751:2009, basada en la anterior, la cual fue adaptada específicamente para la determinación de la estabilidad de los FAMES puros y de las mezclas diésel/FAMES. El método, denominado *Rancimat*, se basa en la determinación conductimétrica de los productos de disociación de ácidos volátiles, principalmente ácido fórmico y acético, producidos durante la oxidación acelerada, obteniendo de esta forma una representación gráfica de la conductividad frente al tiempo. El cálculo del tiempo de inducción se realizó trazando, inicialmente, la tangente a la primera parte de incremento moderado de la curva, y a continuación, la tangente a la parte de la curva con incremento rápido. Se determinó la estabilidad a la oxidación a partir de la lectura en la gráfica del tiempo correspondiente al punto en el que se produce la intersección de las dos tangente. En la Figura III.15 se muestra un ejemplo de la determinación del tiempo de inducción del modo descrito anteriormente.

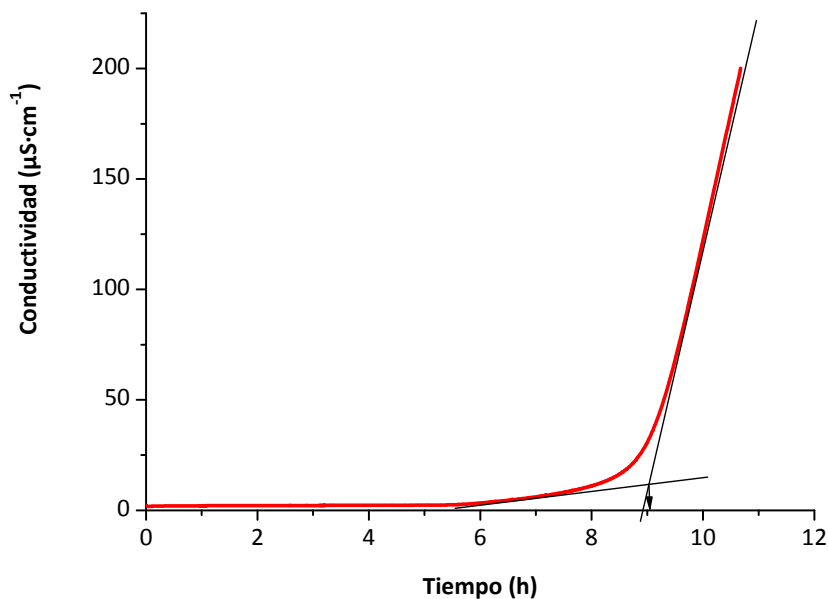


Figura III.15.- Determinación gráfica del tiempo de inducción.

Inicialmente, se fijó la temperatura del baño termostático a 110 °C, la presión del manómetro a 1 atm y el caudal de aire a 10 L h⁻¹. Se pesaron 3 g de muestra y se colocaron en un vial de reacción de borosilicato debidamente sellado. Se rellenó la cubeta de medida con 50 mL de agua destilada y se introdujo en ella el electrodo de medida. La corriente de aire introducida pasa de forma continua por la muestra, primero, y después por la cubeta de medida. El electrodo de conductividad mide los cambios en la conductividad del agua presente en la cubeta de medida. El ensayo finaliza al alcanzar los 200 μS cm⁻¹. Se determinó el periodo de inducción a partir de la gráfica conductividad-tiempo obtenida, como se ha señalado anteriormente.

III.4.4 Estudio de la estabilidad del biodiesel mediante la determinación del contenido en FAMES por GC-FID

Estudio de la influencia del tiempo y la temperatura en la variación del contenido en FAMES del biodiesel

Con objeto de evaluar la estabilidad del contenido en FAMES durante el almacenamiento de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea a partir de diversos aceites vegetales sin usar y de fritura, se estudió inicialmente la influencia del tiempo y la temperatura durante dicho almacenamiento. Para ello, se estudiaron las muestras de biodiesel de aceite de girasol y de semillas, sin usar y de fritura (BAGN, BAGF, BASN y BASF) y se almacenaron a temperatura ambiente y a +4 °C, durante seis meses. El contenido en FAMES se determinó cada mes mediante GC-FID, según el procedimiento descrito en la sección III.4.1 del presente capítulo.

Empleo de antioxidantes para la conservación de las muestras de biodiesel

Se evaluó el empleo de diez antioxidantes como método de conservación de las muestras de biodiesel. Los antioxidantes empleados en la presente Memoria fueron los siguientes:

- 3-tert-butil-4-hidroxianisol (BHA)
- 3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT)
- 2,4,5-trihidroxi-butirofenona (THBP)
- 2,6-di-tert-butil-4-(hidroximetil)fenol (IO)
- etoxiquin (ET)
- ácido nordihidroguaiarético (NDGA)
- tert-butil hidroquinona (TBHQ)
- octil galato (OG)
- propil galato (PG)
- dodecil galato (DG)

Se estudió la adición de tres niveles de concentración (100, 500 y 1.000 mg L⁻¹) de los antioxidantes anteriormente mencionados sobre la muestra de biodiesel de aceite de girasol de fritura (BAGF). Las muestras adicionadas se almacenaron durante seis meses a temperatura ambiente. El contenido en FAMES se determinó a los tres y seis meses de almacenamiento mediante GC-FID, según el procedimiento descrito en la sección III.4.1 del presente capítulo.

III.4.5 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES

III.4.5.1 Determinación del contenido de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel mediante las normas UNE-EN 14107:2003 y UNE-EN 14538:2006

La determinación de Na, K, Ca y Mg en las muestras de biodiesel se llevó a cabo según la norma UNE-EN 14538:2006, mientras que el P se determinó según la norma UNE-EN 14107:2003. En el caso de Na, K, Ca y Mg, el calibrado se preparó en queroseno, añadiendo a cada patrón de calibración 30 g de aceite base 20 y enrasando hasta alcanzar una masa final de 100 g. Las muestras de biodiesel se diluyeron en queroseno, siendo el factor de dilución igual a 2. Para el P, el calibrado se preparó en xileno, añadiendo 10 g de aceite base 75 y enrasando hasta alcanzar una masa final de 100 g. Las muestras de biodiesel se diluyeron en xileno, siendo el factor de dilución igual a 10. En ambos casos se empleó Y como patrón interno.

En el caso de las muestras de aceite, al no existir normativa al respecto, se adaptaron las normas citadas, de forma que la determinación de los cinco elementos se realizó en conjunto. Para ello, el calibrado se preparó en queroseno, utilizando Y como patrón interno y añadiendo a cada patrón de calibración 30 g de aceite base 20 y enrasando hasta una masa final de 100 g. Las muestras de aceite se diluyeron en queroseno, siendo el factor de dilución

igual a 2. En la Tabla III.6 se recogen las longitudes de onda y las concentraciones de los patrones de calibración para la determinación de Na, K, Ca, Mg y P en las muestras estudiadas.

Tabla III.6.- Longitudes de onda y concentraciones de los patrones de calibración para la determinación de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel.

Elemento	λ (nm)	Patrones de calibración (mg kg ⁻¹)	
		Aceite	Biodiesel
Na	588,995		
K	769,896		
Ca	422,673	1; 2,5; 5 y 10	0,5; 1; 5 y 10
Mg	279,553		
P	213,618	1; 5; 10 y 30	0,5; 1; 2 y 4
Y (patrón interno)	371,030		1

Los parámetros instrumentales del espectrómetro de ICP-AES se optimizaron antes de comenzar el análisis empleando una disolución patrón de manganeso con una concentración de 5 mg L⁻¹, permitiéndose así el alineamiento de la antorcha. Las condiciones óptimas de operación para la determinación de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES, según las normas UNE-EN 4538:2006 y UNE-EN 14107:2003, se muestran en la Tabla III.7.

Tabla III.7.- Condiciones instrumentales empleadas para la determinación de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES, según las normas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003.

Parámetros generales	Na, K, Ca y Mg (UNE-EN 14538)	P (UNE-EN 14107)
Potencia de radiofrecuencia	1300 W	1350 W
Voltaje del fotomultiplicador	650 V	
Presión de Ar de nebulización	120 kPa	
Caudal de Ar de enfriamiento	16,5 L min ⁻¹	
Caudal de Ar auxiliar	2,25 L min ⁻¹	
Velocidad de la bomba peristáltica	10 rpm	
Caudal de O ₂ auxiliar	12,5 mL min ⁻¹	

III.4.5.2 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES

Tratamiento de muestra: Mineralización en horno de microondas

Para llevar a cabo la determinación del contenido total de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel, éstas se sometieron a una digestión ácida por vía húmeda, en reactores a presión y empleando un horno de microondas como sistema de calentamiento. Para ello, se pesaron aproximadamente 0,3 g de muestra y se introdujeron en un reactor de teflón TFM del microondas. A continuación, se añadieron 10 mL de una mezcla

de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en proporción 4:1 (v/v) y se sometieron a un calentamiento por microondas empleando el programa indicado en la Tabla III.8, consistente en tres etapas. Una vez enfriados los reactores, éstos se abrieron cuidadosamente y su contenido se enrasó a 25 mL con agua desionizada. Por último, las muestras digeridas se guardaron en frascos de polipropileno y se conservaron en el frigorífico en ausencia de luz a una 4 °C hasta el momento de su análisis por ICP-AES.

Tabla III.8.- Programa de temperaturas del horno microondas.

Etapa	Rampa de tiempo (min)	Rampa de temperatura (°C)	Tiempo de permanencia (min)
1	3	100	0
2	15	170	0
3	10	200	15

Análisis de las muestras mediante ICP-AES

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de los parámetros instrumentales del espectrómetro de ICP-AES, para lo que se empleó una disolución patrón de manganeso con una concentración de 5 mg L⁻¹, permitiéndose así el alineamiento de la antorcha. Las condiciones óptimas de operación para la determinación de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES se encuentran reflejadas en la Tabla III.9.

Tabla III.9.- Condiciones instrumentales empleadas para el análisis multielemental por ICP-AES.

Parámetros generales	
Potencia de radiofrecuencia	1200 W
Voltaje del fotomultiplicador	650 V
Presión de Ar de nebulización	240 kPa
Caudal de Ar de enfriamiento	15,0 L min ⁻¹
Caudal de Ar auxiliar	1,50 L min ⁻¹
Velocidad de la bomba peristáltica	40 rpm

De forma previa al análisis cuantitativo de las muestras, se procedió a realizar un análisis semicuantitativo por ICP-AES, con objeto de conocer el rango de concentraciones en el que están presentes los elementos objeto de estudio en las muestras. Para ello, se realiza un calibrado multielemental entre dos puntos, empleando una disolución de blanco [HNO₃ 2 % (v/v)] y una disolución patrón de 1 mg L⁻¹ de cada elemento en el mismo medio ácido. Con este método, la concentración obtenida (por interpolación o extrapolación sobre la curva de calibrado) para cada analito es sólo aproximada. El análisis semicuantitativo de las muestras permite elegir el intervalo de calibración más adecuado para el análisis cuantitativo de cada analito en las muestras estudiadas. El análisis cuantitativo por ICP-AES se realizó empleando cinco disoluciones patrón de distinta concentración de cada elemento y mediante calibración convencional, utilizando Y como patrón interno. Se analizaron tanto las muestras como los

blancos procedentes de la etapa de tratamiento de muestra. En la Tabla III.10 se muestran los elementos objeto de estudio, las longitudes de onda seleccionadas y los intervalos de calibración correspondientes a los análisis de contenidos totales en las muestras estudiadas.

Tabla III.10.- Longitudes de onda analizadas e intervalos de calibración empleados en la determinación de elementos metálicos y semimetálicos por ICP-AES en las muestras de aceite y biodiesel.

Elemento	λ (nm)	Intervalo de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Aluminio	396,152	100-1000
Arsénico	193,696	100-1000
Bario	455,403	1-100
Calcio	317,933	250-5000
Cadmio	226,502	1-100
Cobalto	228,616	1-100
Cromo	267,716	1-100
Cobre	324,754	1-100
Hierro	238,204	25-1000
Potasio	766,490	25-1000
Magnesio	279,806	25-1000
Manganeso	257,610	25-1000
Molibdeno	202,030	1-100
Sodio	589,592	250-5000
Níquel	352,454	25-500
Fósforo	213,618	250-5000
Plomo	220,353	25-500
Vanadio	292,402	1-100
Cinc	206,200	25-500
Y (patrón interno)	371,030	1

Estabilidad de elementos metálicos y semimetálicos durante el proceso de tratamiento de muestra: Validación del método analítico desarrollado

Con objeto de evaluar la estabilidad de los elementos estudiados durante el proceso de tratamiento de muestra, se llevaron a cabo los correspondientes estudios de recuperación de dichos elementos añadidos sobre muestras de aceite y biodiesel (aceite de girasol sin usar y biodiesel obtenido a partir de ella).

Los ensayos de recuperación se llevaron a cabo tras la adición de disoluciones patrón de los 19 elementos estudiados sobre la muestra de aceite y biodiesel, respectivamente, realizándose el enriquecimiento a dos niveles de concentración (aproximadamente el doble y el cuádruple de la concentración de cada elemento encontrado en cada muestra). Para ello, se adicionaron 300 μL de una disolución patrón que contenía distintas concentraciones de los 19

elementos estudiados sobre 0,3 g de cada muestra de aceite y de biodiesel, realizándose cuatro réplicas de cada muestra.

Las muestras enriquecidas se agitaron en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos para conseguir una perfecta homogeneización de los patrones con las muestras y se conservaron durante 24 horas a una temperatura de 4 °C. Una vez transcurrido dicho tiempo, las muestras enriquecidas se sometieron al proceso de mineralización en horno de microondas mencionado, y una vez digeridas, se analizaron mediante ICP-AES, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

En la Tabla III.11 se muestran las concentraciones de los 19 elementos metálicos y semimetálicos estudiados contenidos en la disolución patrón añadida a la muestra de aceite y biodiesel.

Tabla III.11.- Concentraciones de los 19 elementos estudiados contenidos en la disolución patrón añadida a la muestra de aceite y biodiesel.

Elemento	Concentración de la disolución patrón añadida a la muestra de aceite AGL (mg L ⁻¹)		Concentración de la disolución patrón añadida a la muestra de biodiesel BAGL (mg L ⁻¹)	
	Enriquecimiento doble	Enriquecimiento cuádruple	Enriquecimiento doble	Enriquecimiento cuádruple
Aluminio	0,04	0,08	40	80
Arsénico	0,04	0,08	60	90
Bario	0,001	0,002	2	4
Calcio	180	360	660	1320
Cadmio	0,6	1,2	2	4
Cobalto	0,003	0,006	0,003	0,006
Cromo	0,003	0,006	2	4
Cobre	0,01	0,02	0,01	0,02
Hierro	10	20	120	240
Potasio	140	280	60	120
Magnesio	60	120	0,02	0,04
Manganeso	4	8	1	2
Molibdeno	4	8	0,004	0,008
Sodio	520	1140	80	160
Níquel	0,04	0,08	0,04	0,08
Fósforo	220	440	320	640
Plomo	0,02	0,04	0,02	0,04
Vanadio	0,02	0,04	30	60
Cinc	14	28	60	120

III.4.6 Caracterización de muestras de aceite y biodiesel mediante MALDI-TOF MS

Preparación del target y optimización de la matriz

Las muestras de aceite se disolvieron en cloroformo al 0,4 % (v/v) y se depositaron en el *target* sobre una matriz constituida por 10 mg de 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) disueltos en 1,0 mL de acetona, que contenía un 0,25 % de ácido trifluoroacético (TFA). En cuanto a las muestras de biodiesel, estas se disolvieron en cloroformo al 1 % (v/v), estando la matriz formada por 10 mg de DHB disueltos en 1,0 mL de acetona, que contenía un 0,75 % de TFA. Todas las disoluciones se preparaban diariamente y se conservaba a +4 °C hasta su utilización.

Antes de depositar la matriz sobre el *target*, éste se acondicionaba con etanol al 95 % y agua desionizada, para eliminar impurezas procedentes de análisis previos, y se dejaba secar a temperatura ambiente con una corriente de aire. La disolución de la matriz (1,0 µL) se depositaba sobre el *target* y se dejaba evaporar el disolvente a temperatura ambiente durante, al menos, 30 segundos. A continuación, la muestra de aceite o biodiesel, convenientemente disuelta en cloroformo, se depositaba sobre la matriz correspondiente y se evaporaba el disolvente durante 2 minutos. Finalmente, se introducía el *target* en el espectrómetro MALDI-TOF MS y se obtenían los espectros de masas correspondientes a cada una de las muestras. Las experiencias se realizaron por duplicado. Las condiciones óptimas de operación para el análisis de las muestras de aceite y biodiesel mediante MALDI-TOF MS se encuentran recogidas en la Tabla III.12.

Tabla III.12.- Condiciones instrumentales óptimas empleadas para el análisis de las muestras de aceite y biodiesel mediante MALDI-TOF MS.

Parámetros generales	
Láser de nitrógeno	337 nm 16 Hz
Modo de trabajo	Lineal positivo
Energía del láser para muestras de aceite	100 u.a.
Energía del láser para muestras de biodiesel	80 u.a.
Pulsos de láser por espectro	400
Duración del pulso	3 ns
Presión	$< 10^{-4}$ Pa
Voltaje de aceleración	20 kV
Calibración externa	Fósforo rojo Iones de la matriz

CAPÍTULO IV

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting at the right end of the horizontal line. The horizontal line is positioned below the chapter title and above the main title. The vertical line is positioned to the right of the horizontal line, extending from the top of the horizontal line down to the level of the main title.

DETERMINACIÓN DE FAMES EN MUESTRAS DE BIODIESEL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (GC-FID)

En el presente capítulo, se ha desarrollado y optimizado una metodología analítica para la separación y posterior determinación y cuantificación mediante GC-FID de un grupo de trece FAMES (metil caprato, metil laurato, metil miristato, metil palmitato, metil palmitoleato, metil estearato, metil oleato, metil linoleato, metil linolenato, metil araquidato, metil eicosenoato, metil behenato, metil erucato) en muestras de biodiesel obtenidas mediante la reacción de transesterificación. Se estudiaron y optimizaron las diferentes variables físicas que afectan a la metodología desarrollada y se establecieron los parámetros de calidad del método propuesto. La metodología definida posibilitó la determinación de los trece FAMES estudiados en tiempos de análisis relativamente cortos y con buenos límites de detección y cuantificación.

IV.1 Antecedentes

El biodiesel, como combustible alternativo al diésel convencional, necesita verificar una serie de especificaciones recogidas tanto en la normativa como en la legislación vigente existente al respecto, las cuales caracterizan sus propiedades y garantizan la calidad del producto obtenido. Debe cumplir con los requerimientos exigidos en relación al contenido mínimo de FAMES para su comercialización y utilización en motores diésel, evitando problemas en los mismos, y que se encuentran recogidos en la norma europea UNE-EN 14214:2009 o en la norma americana ASTM D6751-09. Esta exigencia viene impuesta por la posible degradación de los FAMES presentes, por lo que se hace necesario un continuo control de calidad del biodiesel, previo a su comercialización. El contenido total en FAMES presente en el biodiesel es una de las principales características que es necesario evaluar para asegurar la calidad del producto. Además, la cantidad y el tipo de ácidos grasos presentes en un biodiesel es uno de los factores que determinan la viscosidad del mismo, por lo que su estudio es fundamental (Keera *et al.*, 2011).

Según la bibliografía consultada, existen diversos métodos analíticos que permiten determinar el contenido en ésteres metílicos presentes en el biodiesel. Los métodos más ampliamente estudiados han sido: GC (Alcantara *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006; Issariyakul *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2008; Predojević, 2008; Reefat *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Ragonese *et al.*, 2009), HPLC (Di Nicola *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2008; Lertsathapornsuk *et al.*, 2008; Joshi *et al.*, 2009; Nabi *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010a, 2010b), RMN (Knothe, 2001a, 2001b; Meher *et al.*, 2006b; Jin *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2009; Oromí-Farrús *et al.*, 2010) y NIR (Knothe, 1999, 2001b; Oliveira *et al.*, 2006a; Felizardo *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2008). Entre ellos, los métodos basados en la GC y en la HPLC son los más comúnmente empleados por los diferentes autores.

Jin *et al.* (2007) aplicaron un nuevo método de identificación de los productos de la metanolisis de triglicéridos basado en la utilización de la RMN. Oliveira *et al.* (2006a) desarrollaron modelos de calibración basados en FTNIR y FTIR-ATR combinados con el análisis de redes neuronales artificiales (ANN) para determinar el contenido de FAMES en muestras de biodiesel. Baptista *et al.* (2008) utilizaron la NIR, combinada con la calibración multivariante, para la determinación del contenido en FAMES y, en especial, del éster metílico del ácido linoleico en muestras de biodiesel. Recientemente, Borges *et al.* (2011) han desarrollado un modelo matemático que permite determinar el porcentaje de FAMES a partir de la viscosidad dinámica del biodiesel, mediante una ecuación que correlaciona ambas variables.

En cuanto al empleo de HPLC, Foglia *et al.* (2005) definieron un método para separar y cuantificar un conjunto de FAMES en muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes materias primas utilizando HPLC con un sistema de detección de dispersión de la luz por evaporación (ESLV) acoplado con detección UV. Di Nicola *et al.* (2008) propusieron un método para el análisis de mezclas de biodiesel utilizando HPLC en fase inversa no acuosa con

detección UV y Fu *et al.* (2008) desarrollaron un método, también basado en la HPLC, pero con un detector de índice de refracción, para la determinación de los principales FAMES que se encuentran en muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de *yellow horn* (árbol originario de China que produce unas nueces con un elevado contenido oleico).

Generalmente, el análisis de FAMES en muestras de biodiesel se ha realizado mediante GC, debido a su mayor precisión en la cuantificación de los componentes minoritarios. Issariyakul *et al.* (2007) determinaron la composición del biodiesel obtenido a partir de residuos de aceites de fritura, en términos del contenido en FAMES, utilizando la GC acoplada con la espectrometría de masas con un tiempo total de análisis de 40 minutos. De igual forma, Yuan *et al.* (2008) emplearon la misma metodología (GC-MS) para analizar la composición de muestras de biodiesel, con un tiempo total de análisis de 42,73 minutos. Más recientemente, Li *et al.* (2010) han desarrollado un método analítico para la determinación de los FAMES presentes en muestras de biodiesel obtenidas a partir de los jabones que se forman durante el proceso de refinado de los aceites vegetales. Estos autores han utilizado la GC-MS para analizar la composición del biodiesel obtenido a partir de un proceso de acidificación-esterificación de los jabones, con lo que han reutilizado un desecho del proceso de refinado de los aceites vegetales. De esta forma, han determinado un total de seis FAMES presentes en el biodiesel con un tiempo total de análisis de 16,17 minutos

El método más comúnmente utilizado para el análisis de muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de materias primas es la GC con detector de ionización de llama (GC-FID). Wang *et al.* (2006) y Meng *et al.* (2008) utilizaron esta metodología para el análisis de FAMES existentes en muestras de biodiesel producidas a partir de residuos de aceite de cocina. Leung *et al.* (2006a) y Georgogianni *et al.* (2008) también emplearon la GC-FID para la determinación de la composición en FAMES en muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de fritura y de aceite de girasol, respectivamente. Ragonese *et al.* (2009) determinaron, mediante GC-FID, el contenido de FAMES presentes en mezclas de diésel-biodiesel empleando como fase estacionaria de la columna un líquido iónico altamente polar a temperatura ambiente, obteniendo resultados satisfactorios en base a tiempos de retención cortos y una buena precisión de las áreas de pico. Chinnasamy *et al.* (2010) y Krohn *et al.* (2011) también han utilizado la GC-FID para caracterizar el contenido en FAMES presentes en muestras de biodiesel obtenidas a partir microalgas.

IV.2 Composición de los aceites y grasas

En la Tabla IV.1 se recoge la composición en ácidos grasos mayoritarios presentes en los aceites y grasas más frecuentemente utilizados en cocinas, tanto a nivel industrial como en hogares y restaurantes, así como algunos aceites no comestibles.

Tabla IV.1.- Composición, en porcentaje, de los ácidos grasos mayoritarios presentes en algunos tipos de aceites y grasas.

Ácido graso	Aceite/grasa		Oliva	Girasol	Semillas de colza	Soja	Maíz	Coco	Palma	Semillas de lino	Sésamo	Cánola	Aceite de salmón
	Átomos Carbono												
Caprílico	C8:0		-	-	-	-	-	5-9	-	-	-	-	-
Cáprico	C10:0		-	-	-	-	-	4-10	-	-	-	-	-
Laurico	C12:0		-	-	-	-	-	44-51	-	-	-	-	0,2
Mirístico	C14:0		0,05	-	-	0,3	0-2	13-18	1-6	0,2	-	-	7
Palmítico	C16:0		7,5-20	4-6	2-5	7-11	8-10	7-10	32-47	5-9	7-9	2-6	15
Palmitoleico	C16:1		0,3-3,5	-	0,2	0-1	1-2	-	-	-	-	-	6
Margárico	C17:0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Esteárico	C18:0		0,5- 5	1-6	1-2	3-6	1-4	1-4	1-6	0-1	6-8	4-6	3
Oleico	C18:1		55-83	14-43	10-15	22-34	30-50	5-8	40-52	9-29	35-46	52-65	18
Linoleico	C18:2		3,5-21	44-69	10-20	50-60	34-56	1-3	2-11	8-29	35-48	18-25	5
Linolénico	C18:3		0,9	0,3	5-10	2-10	-	-	-	45-67	-	10-11	12
Araquídico	C20:0		0,6	1,4	0,9	5-10	-	-	-	-	-	-	3
Eicosenoico	C20:1		0,4	-	50-60	-	0-2	-	-	-	-	-	-
Behénico	C22:0		0,2	1,4	0,9	5-10	-	-	-	-	-	-	14
Erúcido	C22:1		-	-	50-60	-	0-2	-	-	-	-	1-2	-
Otros	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cont. Tabla IV.1.- Composición, en porcentaje, de los ácidos grasos mayoritarios presentes en algunos tipos de aceites y grasas.

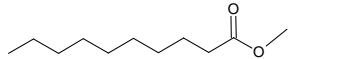
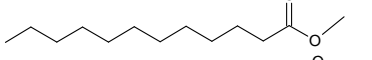
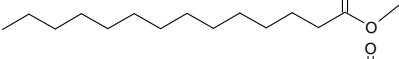
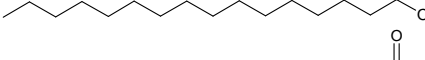
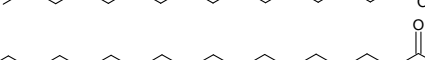
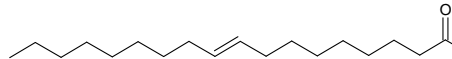
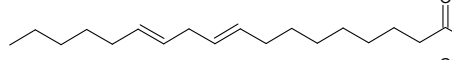
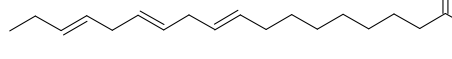
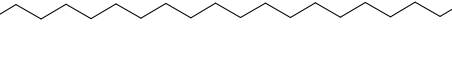

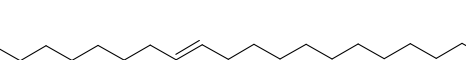


Ácido graso	Aceite/grasa		Semillas de <i>Jatropha curcas</i>	Semillas de palma	Cártamo	Maní	Semillas de algodón	Grasa amarilla	Sebo	Tung	Manteca de cerdo	Mantequilla
	Átomos Carbono											
Caprílico	C8:0		-	2-4	-	-	-	-	-	-	-	1-2
Cáprico	C10:0		-	3-7	-	-	-	-	-	-	-	2-3
Láurico	C12:0		-	45-52	-	-	-	-	0,2	-	-	1-4
Mirístico	C14:0		0-0,1	14-19	-	0,5	0-3	1	2-3	-	1	8-13
Palmítico	C16:0		14-15	6-9	5	6-11	17-23	23	25-30	3	25-30	25-32
Palmitoleico	C16:1		0-1	0-1	-	1-2	-	1	2-3	-	2-5	2-5
Margárico	C17:0		0,1	-	-	-	-	1	2	-	0,5-2	1-2
Esteárico	C18:0		4-10	1-3	2	3-6	1-3	10	21-26	2	12-16	25-32
Oleico	C18:1		34-46	10-18	76	39-66	23-41	50	39-42	4-13	41-51	22-29
Linoleico	C18:2		29-44	1-2	16	17-38	34-55	15	2	8-15	4-22	3
Linolénico	C18:3		0-0,3	-	-	-	-	-	-	72-88	-	-
Araquídico	C20:0		0-0,3	-	-	5-10	-	-	0,4-1	-	-	0,4-2
Eicosenoico	C20:1		-	-	-	-	2-3	-	0,3	1-2	2-3	1,5-2
Behénico	C22:0		0-0,2	1-2	-	5-10	-	-	0,4-1	8	-	0,4-2
Erúcico	C22:1		-	-	-	-	2-3	-	0,3	-	2-3	1,5-2
Otros	-		-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,2	1-2

Como se puede observar en la Tabla IV.1, los ácidos grasos, oleico y linoleico, son mayoritarios en la mayoría de los diferentes tipos de aceites y grasas que se utilizan habitualmente para la cocción de los alimentos. Además, cabe destacar el ácido laurico presente en un elevado porcentaje en aceite de coco y de semillas de palma; el ácido palmítico, en aceite de palma, sebo, manteca de cerdo y mantequilla; el esteárico, en sebo y mantequilla; el linolenico, en aceite de tung y de semillas de lino; y los ácidos eicosenoico y erúxico en aceites procedentes de semillas de colza. En el aceite de girasol el ácido mayoritario es el linoleico. En las semillas de *Jatropha curcas*, los ácidos grasos mayoritarios son los ácidos palmítico, oleico y linoleico. Los aceites con un elevado contenido en ácido linoléico presentan tres dobles enlaces y son fácilmente oxidables, por lo que originan una menor estabilidad en el almacenamiento y, por lo tanto, en los biocombustibles obtenidos a partir de ellos.

En España, el biodiesel se produce mayoritariamente a partir de aceite de girasol, al ser el cultivo oleaginoso más extendido en el territorio español, y de colza. Del total de la superficie de terreno destinada a la agricultura de semillas oleaginosas para la producción de biodiesel, el 90 % se ocupa con el cultivo de semillas de girasol y tan sólo un 10 % es destinado a la siembra de colza. Por el contrario, en Europa los datos se invierten al destinar el 90 % al cultivo de la colza y el resto a las semillas de girasol. Como ya se ha comentado, otra de las materias primas fundamentales para la producción de biodiesel es el aceite procedente de procesos de fritura. De hecho, España es uno de los países de la UE con mayor consumo doméstico de aceite vegetal por habitante y año.

A la vista de los contenidos en ácidos grasos presentes en los diferentes tipos de aceites y grasas, y siendo uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral la determinación del contenido de FAMES en muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites, se seleccionó como objeto de estudio un grupo de trece FAMES comprendidos entre el C10:0 y el C22:1, los cuales no se habían separado y determinado simultáneamente en ningún trabajo previo según la bibliografía consultada. En la Tabla IV.2 se muestran el nombre según la IUPAC, el nombre común, el acrónimo y la fórmula química de cada uno de los FAMES estudiados.

Tabla IV.2.- Nombres, acrónimos y fórmulas químicas de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) objeto de estudio.

Nombre IUPAC	Nombre común	Acrónimo	Fórmula química
Metil decanoato	Metil caprato	C10:0	
Metil dodecanoato	Metil laurato	C12:0	
Metil tetradecanoato	Metil miristato	C14:0	
Metil hexadecanoato	Metil palmitato	C16:0	
Metil cis-9-hexadecenoato	Metil palmitoleato	C16:1	
Metil octadecanoato	Metil estearato	C18:0	
Metil cis-9-octadecenoato	Metil oleato	C18:1	
Metil cis,cis-9,12-octadecadienoato	Metil linoleato	C18:2	
Metil cis-cis-cis-9,12,15-octadecatrienoato	Metil linolenato	C18:3	
Metil araquidato	Metil araquidato	C20:0	
Metil cis-11-eicosenoato	Metil eicosenoato	C20:1	
Metil docosanoato	Metil behenato	C22:0	
Metil cis-13-docosenoato	Metil erucato	C22:1	

IV.3 Estudios previos para la separación cromatográfica

Como paso previo al desarrollo de una metodología analítica que permitiera la separación y posterior cuantificación de los trece FAMES objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se estudió inicialmente el comportamiento de cinco FAMES (metil caprato, metil laurato, metil miristato, metil palmitato, metil estearato). De esta forma, se pretendía examinar la capacidad del método analítico para separar correctamente los FAMES, así como evaluar la necesidad de la utilización de un patrón interno para la correcta cuantificación de los FAMES.

Los cinco FAMES elegidos para la realización de este estudio previo se seleccionaron en base a la composición en ácidos grasos de aceites y grasas (Tabla IV.1). El ácido cáprico y el ácido mirístico son componentes minoritarios de la mayoría de los aceites y grasas empleados como materia prima para la producción del biodiesel. En cambio, el ácido láurico es un componente mayoritario en los aceites producidos a partir de coco y de semillas de palma y minoritario en el resto de los diferentes tipos de aceites y grasas que aparecen recogidas en la Tabla IV.1. El ácido esteárico aparece en cantidades apreciables en el sebo y en la mantequilla, siendo minoritario para el resto de aceites y grasas. Y, finalmente, el ácido palmítico se encuentra en cantidades apreciables en aceites (oliva, palma y semillas de algodón) y grasas (sebo, manteca de cerdo, mantequilla y grasa amarilla). Por lo tanto, los ésteres metílicos de estos cinco ácidos grasos seleccionados para realizar los estudios previos conforman una muestra representativa y característica de los diferentes FAMES presentes en la mayoría de los biodiesel obtenidos a partir de los principales tipos de aceites (comestibles y no comestibles) y grasas.

IV.3.1 Condiciones de la separación cromatográfica

Uno de los mayores inconvenientes que se plantea a la hora de determinar por GC los FAMES presentes en una muestra de biodiesel reside en la utilización de condiciones tales que permitan obtener separaciones precisas en tiempos de análisis que no resulten excesivamente largos, con buenas resoluciones de las correspondientes señales y con condiciones relativamente sencillas a la hora de preparar las disoluciones de las muestras de biodiesel.

Resulta necesario seleccionar la columna cromatográfica y las condiciones que permitan realizar las determinaciones analíticas con la mayor sencillez, dentro de la complejidad requerida. A continuación, se procedió a la optimización de los distintos parámetros que afectan a la separación y determinación simultánea de los FAMES por cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID). Los parámetros considerados fueron:

- Columna cromatográfica
- Caudal de gases
- Velocidad del gas portador
- Volumen de inyección
- Temperatura del inyector
- Temperatura del detector FID
- Elección del disolvente

IV.3.1.1 Columna cromatográfica

Los principales factores que afectan a la columna cromatográfica son la selectividad, que se determina mediante las interacciones fisicoquímicas de las moléculas del soluto con la fase estacionaria, y la polaridad de la misma, que se establece mediante su composición y estructura.

Un éster es un compuesto orgánico de polaridad variable. Dado que en su fórmula general (R-COOR') existe un grupo carbonilo (C=O), éste le confiere a los FAMES una cierta polaridad debido a la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua. Sin embargo, los grupos R y R' son esqueletos carbonados de diferente tamaño, por lo que la polaridad del éster depende en gran medida del tamaño y naturaleza de estos grupos. De esta forma, al aumentar el número de carbonos de la cadena carbonada del FAME (R), la polaridad del mismo disminuye. Por este motivo, es necesario elegir una fase estacionaria cuya polaridad permita separar los diferentes analitos con un tiempo de elución mínimo. En la Tabla IV.3 se recogen algunas fases estacionarias típicas en el análisis de FAMES mediante GC.

Tabla IV.3.- Algunas fases estacionarias típicas en el análisis de FAMEs mediante GC.

Fase estacionaria	Nombre comercial	Polaridad	Marca	Referencias
70 % cianopropil-polisilfenileno siloxano	BPX-70	Polar	SGE	Holser <i>et al.</i> , 2006; Adam <i>et al.</i> , 2008; Hejazi <i>et al.</i> , 2009; Harynuk <i>et al.</i> , 2006.
50 % cianopropil-fenilmetilpolisiloxano	Quadrex 007-CW	No polar	Phenomenex	Chen <i>et al.</i> , 2008.
88 % cianopropil siloxano muy sustituida y estabilizada	CP-Sil 88	Polar	Varian	Kyriakidis <i>et al.</i> , 2000; Koning <i>et al.</i> , 2001; Ratnayake <i>et al.</i> , 2006; Araujo <i>et al.</i> , 2010; Brito <i>et al.</i> , 2009.
100 % polietilenglicol	HP-INNOWAX	Polar	Agilent	Wyatt <i>et al.</i> , 2005; Leung <i>et al.</i> , 2006a; Liu <i>et al.</i> , 2008; Meng <i>et al.</i> , 2008.
Poli (50 % difenil-50 % dimetilsiloxano)	SPB-50	Polar	Sigma-Aldrich	Yamamoto <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2006.
95 % metil -5% fenil polisilfenileno siloxano	BPX-5	No polar	SGE	Kheang <i>et al.</i> , 2006; Harynuk <i>et al.</i> , 2006; Tiyapongattana <i>et al.</i> , 2008.
50 % cianopropil 50 % dimetil polisiloxano	DB-23 (J&W)	Polar	Agilent	Issariyakul <i>et al.</i> , 2007; Watanabe <i>et al.</i> , 2007; Azcan <i>et al.</i> , 2008.
Poli (90 % biscianopropil-10 % cianopropilfenil siloxano) estabilizada	SP-2380	Polar	Supelco	Mondala <i>et al.</i> , 2009; Knothe <i>et al.</i> , 2006; Goodrum <i>et al.</i> , 2005.
5 % fenil-metilpolisiloxano	DB-5HT	No polar	Agilent	Watanabe <i>et al.</i> , 2001; Zullaikah <i>et al.</i> , 2005; Kasim <i>et al.</i> , 2009.
100 % polietilenglicol	TRB-WAX Omega	Polar	Teknokroma	Vicente <i>et al.</i> , 2009.
50 % cianopropilmetil-5 % fenil-metilpolisiloxano	Rtx-225	Polar	Restek	Schreiner, 2005.
90 % biscianopropil-10 % fenilcianopropil polisiloxano	Rtx-2330	Polar	Restek	Samadi <i>et al.</i> , 2004.
90 % cianopropil-polisilfenilenesiloxano	BPX-90	Polar	SGE	Adam <i>et al.</i> , 2008; Harynuk <i>et al.</i> , 2006.
Polietilenglicol	Supelcowax	Polar	Sigma-Aldrich	Oliveira <i>et al.</i> , 2006b; Baptista <i>et al.</i> , 2008.

Como se observa en la Tabla IV.3, las columnas empleadas normalmente para la determinación de FAMES son fases estacionarias polares (cianopropil, siloxano y polietilenglicol), las cuales permiten la separación por número de dobles enlaces, dentro de un grupo de FAMES con el mismo número de átomos de carbono. Las fases estacionarias que permiten la separación de todos los FAMES han sido mejoradas de modo que ha aumentado su polaridad sin producirse una pérdida de estabilidad térmica. La estrategia más extendida ha sido la de aumentar el porcentaje de grupos cianopropil para conseguir una mayor selectividad de la columna. Sin embargo, los resultados son contradictorios en ciertos casos, al permitir mejorar la separación de una serie de FAMES y empeorar la de otros.

De acuerdo con ensayos previos realizados y la bibliografía consultada, se decidió emplear como columna cromatográfica la CP-Sil 88 (Varian), que presenta una fase estacionaria muy sustituida de cianopropil siloxano estabilizada. Esta columna presenta una polaridad extremadamente alta, lo que ofrece una máxima resolución en las separaciones en las que el punto de ebullición y polaridad de los analitos son muy similares, por lo que ofrece una elevada selectividad por los isómeros posicionales y geométricos presentes en los FAMES estudiados.

IV.3.1.2 Caudal de gases

El gas portador es la fase móvil en GC y su misión es la de transportar la mezcla de analitos que se introduce en el inyector hasta el detector, a través de la columna, donde se produce la separación. El gas ideal debe ser químicamente inerte, de elevada pureza y no interaccionar con la fase estacionaria de la columna ni con los componentes de la mezcla.

Los gases más utilizados en este tipo de separaciones como portador son nitrógeno, helio y, menos frecuentemente, hidrógeno, argón o incluso dióxido de carbono. Teniendo en cuenta experiencias previas y la bibliografía consultada al respecto, se decidió emplear como gas portador en el presente trabajo helio de elevada pureza (99,99 %). Con objeto de obtener resultados reproducibles, es esencial conseguir un flujo constante de fase móvil, para poder correlacionar con fiabilidad los tiempos de retención de los patrones analíticos con las señales de la muestra problema. Por estos motivos, se decidió utilizar un caudal de helio de 1,0 mL min⁻¹, caudal de gas óptimo para llevar a cabo la separación cromatográfica de los FAMES. Por otro lado, los gases necesarios para mantener la llama del detector FID son hidrógeno y aire, utilizándose a unos caudales de 30 y 400 mL min⁻¹, respectivamente. Asimismo, se emplea nitrógeno, a un caudal de 30 mL min⁻¹, como gas auxiliar o gas “*make up*”, que permite estabilizar la llama en el detector, aumentando la sensibilidad del mismo al disminuir el ruido de la línea base.

IV.3.1.3 Velocidad del gas portador

La velocidad del gas portador se modificó entre 13,5 y 55,5 cm s⁻¹, que equivalen a una presión en cabeza de columna entre 9 y 36,5 psi. Analizando diferentes tipos de velocidades

lineales del gas portador, se pudo observar que presiones en cabeza de columna superiores a 28,1 psi proporcionaban los valores de altura equivalente de plato teórico más bajos para la mayoría de los FAMEs estudiados, con lo que se mejoraba la eficacia de la separación.

Por lo tanto, se estableció que la velocidad del gas portador debería presentar un valor de 34,6 cm s⁻¹, que equivale a una presión en cabeza de columna de 28,1 psi. Este valor proporcionó una eficacia de la columna satisfactoria, ya que permitió obtener una buena resolución para la señal de todos los FAMEs estudiados, con un bajo ruido de fondo de la línea base.

IV.3.1.4 Volumen de inyección de muestra

En este estudio, se compararon los resultados obtenidos mediante la inyección de volúmenes de muestra comprendidos entre 0,1 y 1 µL. Se observó la existencia de una relación lineal entre el volumen inyectado y el área de pico obtenida para los FAMEs objeto de estudio. Se seleccionó como óptimo un volumen de inyección de muestra de 0,1 µL, para obtener una buena sensibilidad y un bajo ruido de la línea base.

Se operó en el modo *split* del inyector. El flujo de *split* o relación de división de la muestra es un parámetro que es necesario optimizar. En general, la inyección con *split* es la técnica más adecuada para analizar muestras que presentan elevados contenidos de los analitos a determinar, ya que solamente se introduce en la columna cromatográfica una pequeña parte del volumen de muestra inyectado, lo que permite evitar el rápido deterioro de la columna. Este sistema de introducción de muestra es menos eficaz para el análisis de analitos presentes a nivel de trazas, ya que la cantidad de muestra que llega a la columna se reduce drásticamente. Teniendo en cuenta que los FAMEs son componentes mayoritarios en las muestras de biodiesel, se decidió inyectar la muestra siguiendo el modo *split* empleado una relación 1:20, que permitió obtener las mejores resoluciones para todos los picos cromatográficos.

IV.3.1.5 Temperatura del inyector

En la zona de inyección, la temperatura debe ser suficientemente elevada para vaporizar completamente las muestras de biodiesel pero sin producir su descomposición térmica. La temperatura del inyector se modificó entre 200 y 280 °C y se evaluó su efecto en los tiempos de retención y áreas de pico de los cinco FAMEs estudiados. Como era de esperar, los tiempos de retención de los FAMEs no se vieron afectados al aumentar la temperatura, mientras que las áreas de pico aumentaron entre 200 y 250 °C, observándose una disminución de éstas para temperaturas superiores. Por lo tanto, se seleccionó una temperatura del inyector de 250 °C como la más apropiada para obtener señales óptimas para los analitos estudiados.

IV.3.1.6 Temperatura del detector FID

La optimización de la temperatura del detector permite obtener la máxima sensibilidad en las determinaciones. Esta temperatura debe ser elevada para evitar la condensación de la muestra, lo que daría lugar a pérdidas de los componentes menos volátiles o a un solapamiento entre los picos. Sin embargo, si es excesivamente alta, el detector puede resultar dañado e incluso es posible que pueda aumentar el ruido de la línea base. Por esto, se consideró el efecto de este parámetro sobre los tiempos de retención y las áreas de pico. Se ensayaron varias temperaturas del detector comprendidas entre 200 y 300 °C. Los tiempos de retención de los diferentes FAMES no se vieron afectados en este intervalo de temperaturas, mientras que las áreas de pico aumentaron lentamente a medida que se incrementaba la temperatura. Con objeto de obtener la máxima sensibilidad sin provocar el deterioro del detector, se optó por 250 °C como temperatura óptima de trabajo.

IV.3.1.7 Elección del disolvente

El disolvente debe permitir que todos los compuestos de interés presentes en la matriz sometida a análisis, ya sean los patrones analíticos de los FAMES o las muestras de biodiesel, sean solubles en él y su tiempo de retención no debe interferir en la obtención de los picos cromatográficos de los analitos de interés.

Los FAMES presentan carácter apolar, por lo que es necesario emplear un disolvente apolar para poder disolverlos. Se estudió la solubilidad, tanto de los FAMES seleccionados como de las muestras de biodiesel, en tres disolventes apolares, como son: iso-octano, ciclohexano y n-hexano. Se observó que, tanto los patrones analíticos de los FAMES como las muestras de biodiesel, eran solubles en estos tres disolventes. En la Tabla IV.4 se muestran las principales características físico-químicas de los disolventes estudiados.

Tabla IV.4.- Características físico-químicas de los disolventes empleados.

Índice de polaridad	Disolvente	Viscosidad (cP a 20 °C)	Punto de ebullición (°C a 1 atm)	Presión de vapor (kPa a 20 °C)	Densidad (g cm ⁻³)
-0,4	Iso-octano	0,50	99,2	5,1	0,69
0,0	n-hexano	0,31	68,7	16,0	0,66
0,0	Ciclohexano	0,98	80,7	12,7	0,80

A continuación, se determinó el tiempo de retención, mediante GC-FID, de cada uno de los disolventes estudiados. Para ello, se realizaron una serie de inyecciones de cada uno de los disolventes en ausencia de analitos, utilizando un programa isotérmico para el horno de la columna, para tener una idea aproximada del tiempo de retención. La Tabla IV.5 muestra los tiempos de retención obtenidos para cada uno de los disolventes estudiados.

Tabla IV.5.- Tiempos de retención de los disolventes estudiados.

Disolvente	t_r (min)
Iso-octano	7,64
n-hexano	4,11
Ciclohexano	6,86

De acuerdo con las Tablas IV.4 y IV.5, se observa que el n-hexano es el disolvente que presenta una menor viscosidad (0,31 cP) y un menor tiempo de retención (4,11 min), por lo que cabe esperar que su señal no interfiera con la de los FAMES objeto de estudio, por lo que se seleccionó para los siguientes ensayos.

IV.4 Estudio del sistema de cinco FAMES sin patrón interno

IV.4.1 Separación cromatográfica

En esta primera parte del proceso de optimización de la separación cromatográfica y con objeto de conseguir una resolución y cuantificación apropiada para los cinco FAMES estudiados, se optimizaron las diferentes variables que afectan al sistema sin emplear un patrón interno.

Se procedió a optimizar las condiciones experimentales a utilizar en la separación de los cinco FAMES. Para ello se realizaron diferentes ensayos en el programa de temperaturas del horno de la columna, con objeto de obtener una resolución cromatográfica satisfactoria que permitiera separar los cinco compuestos analizados preparados en una disolución de n-hexano. Las condiciones cromatográficas que se emplearon para dicha separación fueron las siguientes:

- Temperatura del detector (FID): 250 °C
- Temperatura del inyector: 250 °C
- Volumen de inyección: 0,1 μ L
- Programa de temperaturas del horno:
 - Temperatura inicial de 150 °C durante un minuto
 - Temperatura de 200 °C a una velocidad de 3 °C min^{-1} , manteniéndose durante los últimos 5 minutos del análisis

En la Figura IV.1 se muestra el cromatograma obtenido a partir de una disolución patrón de la mezcla de los cinco FAMES, bajo las condiciones experimentales anteriores.

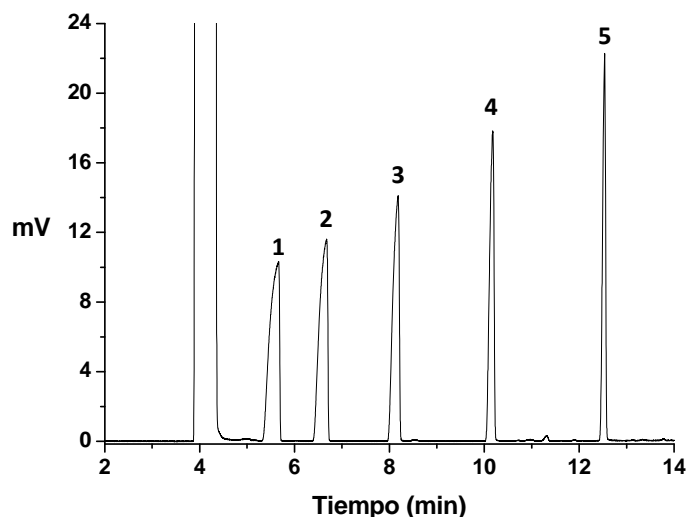


Figura IV.1.- Cromatograma obtenido para una mezcla de cinco FAMES de concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ disueltos en n-hexano según el programa de temperatura siguiente:

1) $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min; 2) $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min ($3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). (1) Metil caprato. (2) Metil laurato. (3) Metil miristato. (4) Metil palmitato. (5) Metil estearato.

Se observa que la separación de la mezcla de ésteres metílicos fue satisfactoria, presentando buenas resoluciones para las correspondientes señales analíticas y con un tiempo total de análisis inferior a 13 minutos. La identificación de cada uno de los FAMES analizados mediante GC-FID se realizó mediante la inyección de cada uno de los ésteres individualmente. En la Tabla IV.6 se muestran los tiempos de retención determinados para cada uno de los FAMES analizados y sus correspondientes desviaciones estándar, para cinco determinaciones.

Tabla IV.6.- Tiempos de retención y desviaciones estándar (s) obtenidas mediante GC-FID (n=5).

Pico	FAME	t_R (min)	s
1	C10:0	5,65	0,04
2	C12:0	6,67	0,02
3	C14:0	8,18	0,01
4	C16:0	10,18	0,02
5	C18:0	12,54	0,01

IV.4.2 Validación del método analítico

La validación de un método analítico permite poner de manifiesto si los resultados producidos por el mismo son fiables y reproducibles, así como si es utilizable para la aplicación pretendida. Las características de funcionamiento que deben poseer los métodos analíticos se concretan en parámetros de calidad, como el intervalo dinámico de linealidad, la exactitud, la precisión y los límites de detección y cuantificación del método.

Por lo tanto, las metodologías analíticas deben poseer características de funcionamiento adecuadas a la aplicación en la que se vaya a emplear, que se concretan en los denominados parámetros de calidad del método. Para establecer el intervalo de aplicabilidad del método cromatográfico, se han construido las curvas de calibrado empleando el área de

pico como medida de la respuesta analítica. Se ensayaron en total diez niveles de concentración ($n=10$) de cada uno de los cinco FAMES para evaluar la linealidad del mismo. Todas las disoluciones patrón se prepararon en n-hexano. Las curvas se sometieron a regresión lineal y se utilizó el coeficiente de correlación (r) como valor representativo de la linealidad. De esta forma, la linealidad fue evaluada en el rango de concentraciones comprendido entre $0,5$ y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En la Tabla IV.7 se recogen los principales parámetros de calidad del método para cada uno de los analitos estudiados, como las pendientes y sus desviaciones estándar ($b \pm S_b$), ordenadas en el origen y sus desviaciones estándar ($a \pm S_a$), y los valores del error estándar de la estimación ($S_{y/x}$) y de los coeficientes de correlación (r) para cada uno de los FAMES estudiados.

Tabla IV.7.- Parámetros de validación de la recta de calibrado sin patrón interno.

Pico	FAME	$(b \pm S_b) \cdot 10^{-3}$ ($n=10$) (cps mL μg^{-1})	$(a \pm S_a) \cdot 10^{-3}$ ($n=10$) (cps)	$S_{y/x}$	r
1	C10:0	$14,1 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,2$	0,3611	0,9976
2	C12:0	$13,6 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,1$	0,2855	0,9983
3	C14:0	$13,0 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,1$	0,3214	0,9978
4	C16:0	$11,4 \pm 0,2$	$0,30 \pm 0,09$	0,2195	0,9986
5	C18:0	$9,7 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,1$	0,2584	0,9974

*Intervalos de confianza (S_a y S_b) calculados al 95 % de nivel de confianza

Como se puede observar en la Tabla IV.7, los coeficientes de correlación son superiores a 0,9974 en todos los casos, lo que nos indica una buena linealidad entre la señal analítica y la concentración de cada uno de los FAMES. Por otro lado, se observa que los valores obtenidos para los $S_{y/x}$ son elevados para todos los analitos, por lo que será necesario emplear un patrón interno para conseguir eliminar las fluctuaciones de la señal de respuesta del instrumento y así poder mejorar la precisión de la calibración.

A continuación, se calcularon los correspondientes límites de detección (LD) y cuantificación (LQ). El límite de detección es el parámetro de calidad que indica la capacidad de detección del método y existen diferentes métodos para calcularlo. Según la IUPAC, el límite de detección es la concentración, o la cantidad de analito, establecida mediante la menor medida que pueda detectarse con una certeza razonable mediante un procedimiento analítico. Dicho valor mínimo de la medida se determina como la suma entre la media de un cierto número de valores del blanco y tres veces la desviación estándar de las medidas del blanco. Sin embargo, esta expresión no tiene en cuenta la imprecisión del valor de la pendiente y la ordenada en el origen obtenida en la regresión.

En los métodos cromatográficos, es difícil definir el concepto de blanco y medir su valor, por lo que se han propuesto otras metodologías para la determinación del límite de detección y cuantificación. En el presente estudio, LD y LQ fueron calculados a partir de tres y

diez veces, respectivamente, la desviación estándar de diez determinaciones de la disolución patrón de menor concentración empleada en el calibrado, ya que en el caso de una técnica cromatográfica, suele ocurrir que la señal correspondiente al blanco no sea discernible de la línea base del cromatograma, es decir, el blanco no da lugar a ningún pico cromatográfico cuantificable.

En la Tabla IV.8 se muestran los límites de detección y de cuantificación obtenidos para cada uno de los FAMES estudiados.

Tabla IV.8.- Límites de detección y de cuantificación del método optimizado.

Pico	FAME	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	C10:0	770	2,6
2	C12:0	630	2,1
3	C14:0	740	2,5
4	C16:0	580	1,9
5	C18:0	800	2,7

Puede observarse que los valores de los límites de detección obtenidos para cada uno de los FAMES estudiados presentan valores comprendidos entre 580 y 800 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los límites de cuantificación oscilaron entre 1,9 y 2,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esto puso de manifiesto la necesidad de utilizar un patrón interno en la separación cromatográfica, con objeto de mejorar los límites de detección y cuantificación del método analítico desarrollado.

IV.5 Estudio del sistema de cinco FAMES con patrón interno

IV.5.1 Elección del patrón interno

Como se ha comentado, la cuantificación de los FAMES podría verse interferida por varias causas, por lo que se decidió realizar la calibración mediante el empleo de un patrón interno. El patrón interno es una sustancia que debe ser lo más similar posible al analito pero no debe aparecer originalmente en la muestra. Entre los patrones internos más ampliamente empleados en la bibliografía consultada se encuentran los siguientes FAMES: heptanoato de metilo (C7:0), undecanoato de metilo (C11:0), heptadecanoato de metilo (C17:0) y el tricosanoato de metilo (C23:0).

El heptanoato de metilo (C7:0) fue descartado inicialmente ya que procede de un ácido graso relativamente volátil y eluye al comienzo del cromatograma, por lo que podría solaparse con el pico cromatográfico correspondiente al disolvente. El heptadecanoato de metilo (C17:0) ha sido ampliamente utilizado como patrón interno por diversos autores (UNE-EN 14103:2003; Felizardo *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006a; Luo *et al.*, 2006; Kawashima *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Halim *et al.*, 2009). Sin embargo, según Schober *et al.* (2006) algunas grasas animales pueden contener ácido heptadecanoico en su composición, por lo que su presencia puede interferir con el patrón interno a la hora de cuantificar el contenido de los FAMES en las

muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites vegetales o grasas animales. Por este motivo, el heptadecanoato de metilo tampoco fue seleccionado como patrón interno en este estudio. Otros autores (El-Mashad *et al.*, 2008; Armenta *et al.*, 2009; Schober *et al.*, 2009) han empleado el tricosanoato de metilo (C23:0) como patrón interno, aunque su elevado peso molecular hace que su tiempo de retención sea elevado, por lo que también se descartó su empleo.

Finalmente, se decidió optar por el undecanoato de metilo (C11:0) como patrón interno (Ngamcharussrivichai *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2009, 2010a, 2010b), que presentó un tiempo de retención bajo al ser relativamente volátil, y en el cromatograma eluía entre el metil caprato (C10:0) y el metil laurato (C12:0). Se comprobó cromatográficamente que la utilización de este FAME como patrón interno no producía ninguna interferencia con los FAMES objeto de estudio, a la vez que presentaba un tiempo de retención apropiado.

IV.5.2 Separación cromatográfica

Se procedió a realizar la calibración del método cromatográfico utilizando el metil undecanoato como patrón interno, con objeto de eliminar o minimizar las posibles interferencias físicas. El empleo de un patrón interno en la calibración consiste en añadir tanto a los patrones como a la muestra una cantidad exactamente medida de un componente puro, ausente en la muestra, utilizándose como parámetro analítico la relación de áreas de pico del analito y del patrón interno. Para aplicar este método en GC, es necesario que la señal analítica correspondiente al patrón interno esté aislada de los picos de los demás componentes de la muestra de los FAMES. Su principal ventaja es que con él se eliminan los problemas de fluctuación instrumental y se minimizan los errores instrumentales, ya que tanto el analito como el patrón interno experimentan las mismas variaciones. Por tanto, el cociente obtenido entre las áreas del analito y del patrón interno depende solamente de la concentración de analito.

Se añadieron $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metil undecanoato como patrón interno, ya que éste debe estar en cantidad suficiente para poder ser determinado sin problemas con respecto a los demás analitos. Se utilizaron las condiciones cromatográficas comentadas en la sección IV.4.1. En la Figura IV.2 se muestra el cromatograma obtenido para una disolución patrón de la mezcla de los cinco FAMES a la que se añadió el patrón interno.

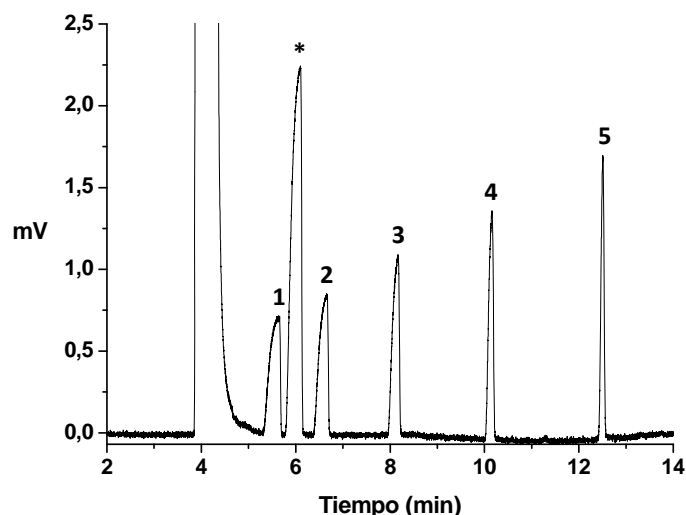


Figura IV.2.- Cromatograma obtenido para una mezcla de cinco FAMES, junto con el patrón interno, de concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ disueltos en n-hexano según el programa de temperatura siguiente: 1) $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min; 2) $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min ($3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). (1) Metil caprato. (2) Metil laurato. (3) Metil miristato. (4) Metil palmitato. (5) Metil estearato. (*) Patrón interno, de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se puede observar que el tiempo total necesario para realizar el cromatograma de la mezcla de FAMES junto con el patrón interno es inferior a 14 minutos. En la Tabla IV.9 se muestran los tiempos de retención medios determinados para cada uno de los FAMES analizados y sus correspondientes desviaciones estándar, para cinco determinaciones.

Tabla IV.9.- Tiempos de retención con sus correspondientes desviaciones estándar (s), empleando el patrón interno, obtenidos mediante GC-FID (n=5).

Pico	FAME	t_R (min)	s
1	C10:0	5,61	0,02
2	C12:0	6,65	0,03
3	C14:0	8,17	0,01
4	C16:0	10,15	0,01
5	C18:0	12,51	0,02

Se puede observar que los tiempos de retención son muy similares a los obtenidos cuando se realizó la separación cromatográfica sin emplear patrón interno (Tabla IV.6), lo que podría sugerir una buena reproducibilidad del método analítico.

IV.5.3 Validación del método analítico

Para establecer el intervalo de linealidad proporcionado por el método cromatográfico optimizado utilizando patrón interno, se determinaron las curvas de calibrado empleando el cociente entre las áreas de cada uno de los analitos en relación con el área del patrón interno para obtener las áreas “normalizadas” como medida de la respuesta analítica. A partir de los cocientes de áreas, se obtuvieron las correspondientes curvas de calibrado para cada uno de los FAMES.

Se ensayaron diez niveles de concentración ($n=10$) de cada uno de los FAMES, en el rango de concentraciones comprendido entre 0,5 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para determinar las curvas de calibrado del método analítico. Las curvas se sometieron a regresión lineal y se utilizó el coeficiente de correlación (r) como valor representativo de la linealidad. En la Tabla IV.10 se recogen los principales parámetros de calidad del método analítico optimizado con el empleo del patrón interno, como son las rectas de calibrado (pendientes y ordenadas en el origen con sus respectivas desviaciones estándar), y los valores del error estándar de la estimación ($S_{y/x}$) y de los coeficientes de correlación (r) para cada uno de los FAMES estudiados obtenidos a partir de las áreas normalizadas.

Tabla IV.10.- Parámetros de validación de la recta de calibrado normalizada con patrón interno (metil undecanoato, $t_R=6,10$ min).

Pico	FAME	$(b \pm S_b) \cdot 10^{-3}$ ($n=10$) (cps mL μg^{-1})	$(a \pm S_a) \cdot 10^{-3}$ ($n=10$) (cps)	$S_{y/x}$	r
1	C10:0	34,8 \pm 0,4	3,2 \pm 1,7	0,0421	0,9994
2	C12:0	34,2 \pm 0,4	7,9 \pm 1,6	0,0446	0,9993
3	C14:0	32,5 \pm 0,4	7,3 \pm 1,8	0,0448	0,9993
4	C16:0	28,9 \pm 0,4	7,7 \pm 1,5	0,0370	0,9992
5	C18:0	24,2 \pm 0,3	3,8 \pm 1,3	0,0301	0,9995

*Intervalos de confianza (S_a y S_b) calculados al 95 % de nivel de confianza

Como se puede observar en la Tabla IV.10, el empleo de las áreas normalizadas permite obtener unos mejores coeficientes de correlación (r), ya que en todos los casos son superiores a 0,9992, lo que indica una mejora significativa de la linealidad de las rectas de calibrado. Por otro lado, se observa que los valores obtenidos para los $S_{y/x}$ son significativamente inferiores a los obtenidos en la Tabla IV.7 para todos los analitos, por lo que se reducen los errores instrumentales.

Por último, se calcularon los límites de detección y cuantificación del mismo modo anterior. En la Tabla IV.11 se muestran los valores de los límites de detección y cuantificación obtenidos con las áreas normalizadas al utilizar un patrón interno.

Tabla IV.11.- Límites de detección y de cuantificación normalizados con patrón interno.

Pico	FAME	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	C10:0	360	1,2
2	C12:0	390	1,3
3	C14:0	410	1,4
4	C16:0	380	1,3
5	C18:0	410	1,2

Como ponen de manifiesto los valores que se recogen en la Tabla IV.11, el empleo de patrón interno permitió disminuir los límites de detección y cuantificación en,

aproximadamente, un 50 % en relación con los valores obtenidos en ausencia de patrón interno. Por lo tanto, la calibración con patrón interno permite mejorar los resultados del método cromatográfico, por lo que es necesaria su utilización para la determinación y cuantificación de los FAMES.

IV.6 Optimización de las condiciones de la separación cromatográfica de los trece FAMES

Una vez determinadas las mejores condiciones analíticas que permitían la correcta separación de los cinco FAMES, se procedió a ampliar el estudio a los trece FAMES que se han considerado como objeto de estudio en la presente Memoria. Para ello se preparó una mezcla de los trece FAMES estudiados a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno de ellos en n-hexano, a la que se añadió metil undecanoato como patrón interno a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se inyectó en la columna cromatográfica un volumen de $0,1 \mu\text{L}$ siguiendo las condiciones experimentales óptimas determinadas para la mezcla de los cinco analitos estudiadas en las secciones anteriores. En la Figura IV.3 se muestra el cromatograma obtenido para una disolución patrón de la mezcla de los trece FAMES con el patrón interno.

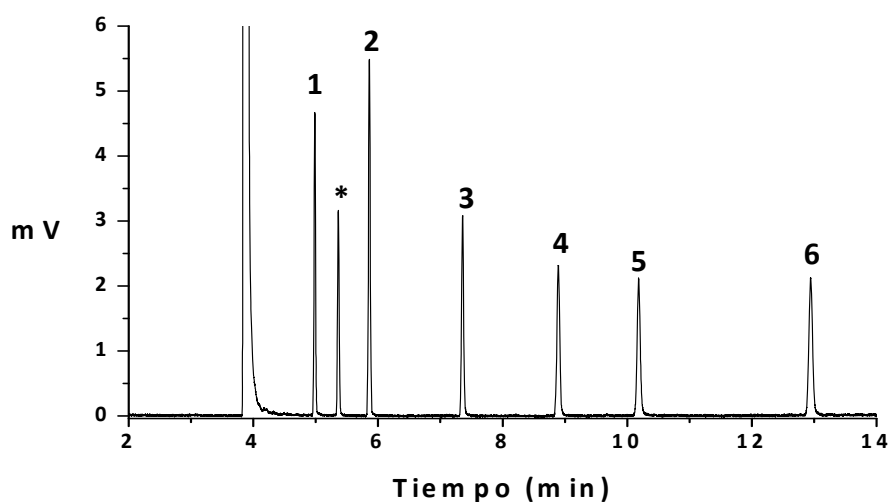


Figura IV.3.- Cromatograma obtenido para una mezcla de trece FAMES de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ disueltos en n-hexano, según el programa de temperatura óptimo obtenido para la mezcla de los cinco FAMES, que es el siguiente: 1) $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min; 2) $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min ($3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). (1) Metil caprato. (2) Metil laurato. (3) Metil miristato. (4) Metil palmitato. (5) Metil palmitoleato. (6) Metil estearato. (*) Patrón interno, de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como se puede apreciar en la mencionada figura, y como era de esperar, el programa de temperatura optimizado para la separación de los cinco FAMES no permitió la correcta separación a línea base de los trece FAMES, ya que sólo fue posible separar los seis primeros analitos estudiados, debido a que el tiempo total de análisis era muy corto. Se hizo necesario realizar un conjunto de experiencias adicionales en las que se modificó el programa de temperatura de la columna cromatográfica para lograr la separación de los analitos.

IV.6.1 Programa de temperatura del horno de la columna

Como se ha comentado, la temperatura de la columna es un factor crítico en GC, ya que tiene una influencia decisiva en la separación cromatográfica. A partir de las condiciones experimentales previas señaladas en las secciones IV.4.1 y IV.5.2, se realizaron varios ensayos con el fin de encontrar un programa de temperatura que proporcionase una separación cuantitativa de los trece FAMES estudiados junto con el patrón interno seleccionado (metil undecanoato), en el menor tiempo posible y con las mejores resoluciones para cada una de las señales analíticas de los diferentes analitos estudiados.

La descripción de los programas de temperatura con dos y tres rampas ensayados y la nomenclatura utilizada, se indican en las Figuras IV.4 y IV.5, respectivamente, en las que:

- T_i ($^{\circ}\text{C}$) es la temperatura a la que se mantiene el horno al comienzo de cada etapa
- T_f ($^{\circ}\text{C}$) es la temperatura que alcanza el horno al final del programa
- t_i (min) es el tiempo durante el cual se mantiene el horno a la temperatura inicial de cada etapa (T_i)
- t_f (min) es el tiempo durante el cual se mantiene el horno a la temperatura final alcanzada (T_f)
- v_i ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$) es la velocidad a la que el horno se calienta para alcanzar la temperatura final de cada etapa

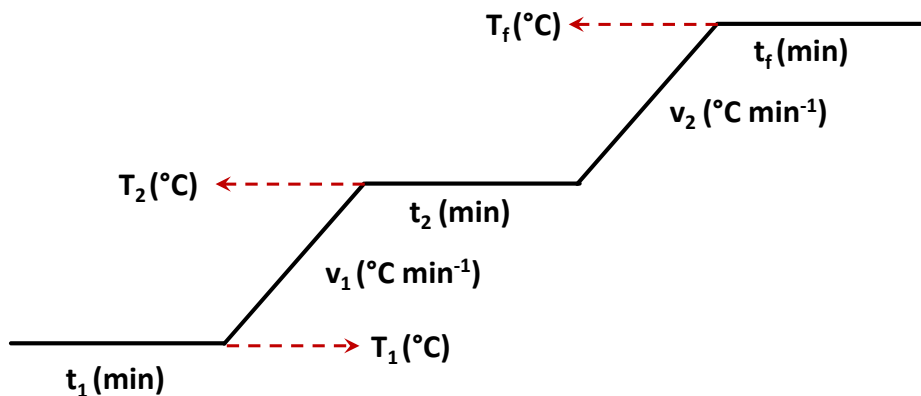


Figura IV.4.- Programa de temperatura con dos rampas.

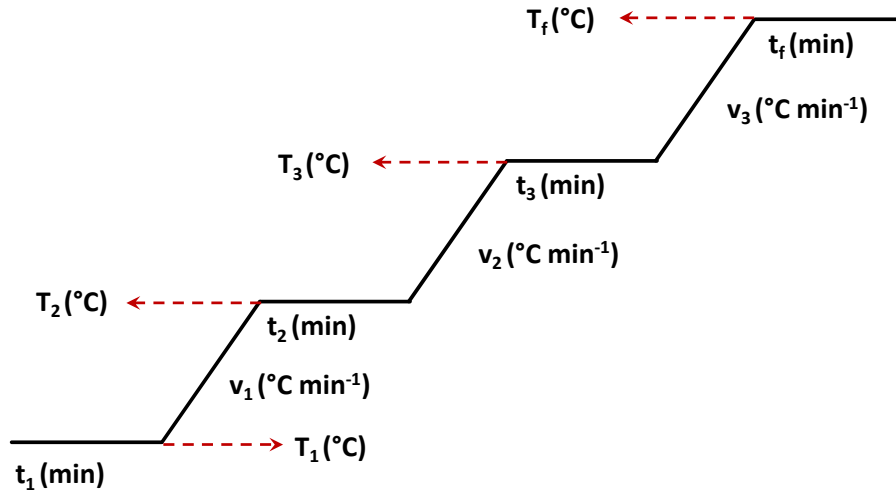


Figura IV.5.- Programa de temperatura con tres rampas.

Los distintos programas de temperatura ensayados con dos y tres rampas, se muestran en las Tablas IV.12 y IV.13, respectivamente.

Tabla IV.12.- Programas de temperatura con dos rampas.

Programa	T_i (°C)	t_i (min)	v_1 (°C min ⁻¹)	T_2 (°C)	t_2 (min)	v_2 (°C min ⁻¹)	T_f (°C)	t_f (min)	t_{total} (min)
A	150	1	4	170	5	4	200	5	23,50
B	150	1	4	170	5	30	200	5	30,00
C	160	1	3	170	5	2	200	2	26,33
D	168	0,50	2	170	5	1	200	1	37,50
E	165	0,50	1	170	5	2	190	1	21,50
F	160	1	3	170	5	1	200	2	41,33
G	160	1	3	170	5	3	200	5	20,00
H	160	1	4	170	5	5	210	5	21,50

Tabla IV.13.- Programas de temperatura con tres rampas.

Programa	T _i (°C)	t _i (min)	v ₁ (°C min ⁻¹)	T ₂ (°C)	t ₂ (min)	v ₂ (°C min ⁻¹)	T ₃ (°C)	t ₃ (min)	v ₃ (°C min ⁻¹)	T _f (°C)	t _f (min)	t _{total} (min)
I	160	1	3	170	5	1	180	1	0,5	190	2	42,33
J	160	1	3	170	5	4	200	5	3	225	5	35,17
K	160	1	3	170	5	5	200	3	3	212	2	24,33
L	160	1	3	170	5	6	200	3	3	210	3	24,67
M	160	1	3	170	5	9	200	3	3	210	4	23,00
N	160	1	3	170	5	12	200	3	3	210	3	21,17
O	160	1	3	170	5	14	200	3	3	210	2	19,81
P	160	1	3	170	5	16	200	3	3	210	2	19,54
Q	160	1	3	170	5	20	200	3	3	210	2	19,17
R	160	1	3	170	5	30	200	3	3	210	3	19,67
S	160	1	8	170	5	30	200	5	10	210	5	19,25

Para determinar el programa de temperatura óptimo, se analizó la mezcla de trece FAMES con metil undecanoato como patrón interno mediante GC-FID, utilizando los programas descritos en las Tablas IV.12 y IV.13. A continuación, se describen pormenorizadamente tres programas de temperatura, para poder observar la evolución del proceso de optimización.

El programa de temperatura B (Tabla IV.12) consiste en una temperatura inicial de la columna de 150 °C durante un minuto. A continuación, la temperatura se incrementó hasta 170 °C a razón de 4 °C min⁻¹, permaneciendo a esta temperatura durante 5 minutos. Después, se aplicó una rampa de temperatura de 30 °C min⁻¹ hasta alcanzar 200 °C, manteniéndose a dicha temperatura durante 5 minutos. El tiempo total de análisis cromatográfico obtenido mediante este programa fue de 30 minutos. La Figura IV.6 muestra un cromatograma obtenido al aplicar el programa de temperatura B. En la Tabla IV.14 se recoge el orden de elución de los trece FAMES estudiados junto con el patrón interno. Las señales se identificaron en función de los tiempos de retención obtenidos, mediante inyecciones individuales de los FAMES.

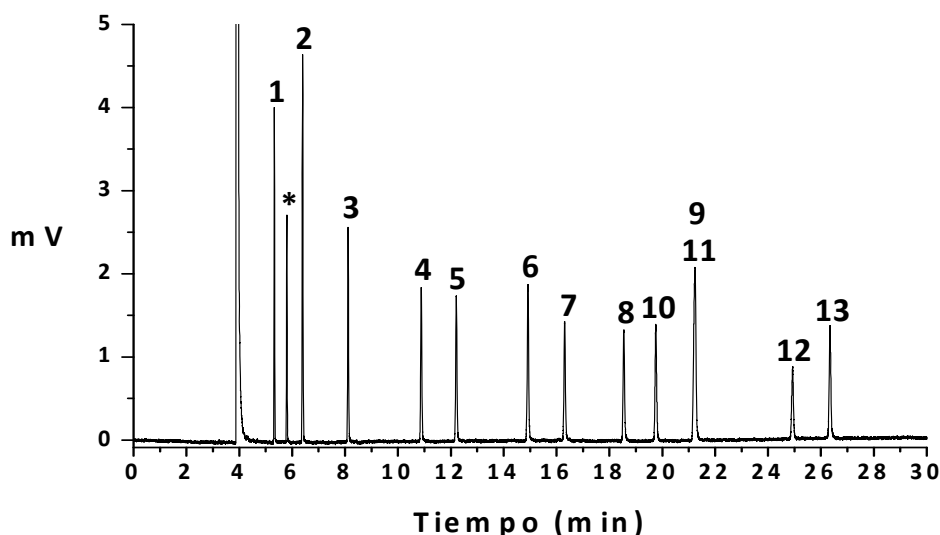


Figura IV.6.- Cromatograma obtenido para una mezcla de trece FAMES de concentración 100 µg mL⁻¹ disueltos en n-hexano, según el programa de temperatura (B): 1) 150 °C durante 1 min; 2) 170 °C durante 5 min (4 °C min⁻¹) y 3) 200 °C durante 5 min (30 °C min⁻¹). (*Patrón interno, de concentración 100 µg mL⁻¹).

Tabla IV.14.- Orden de elución de los trece FAMES estudiados y el patrón interno.

Pico	1	*	2	3	4	5	6
FAME	C10:0	C11:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0
Pico	7	8	9	10	11	12	13
FAME	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1

Como se puede apreciar en la Figura IV.5, el metil linolenato (pico 9) y el metil eicosenoato (pico 11) aparecen solapados, por lo que este programa de temperatura no permite la separación a línea base de los trece FAMES estudiados.

Otro de los programas de temperatura que se ensayó (programa G de la Tabla IV.12) durante el proceso de optimización comenzó con una temperatura inicial de 160 °C durante un minuto. A continuación, la temperatura se incrementó hasta 170 °C a razón de 3 °C min⁻¹, manteniéndose a esta temperatura durante 5 minutos. Después, se aplicó una rampa de temperatura de 3 °C min⁻¹ hasta alcanzar 200 °C, manteniéndose a esta temperatura durante 5 minutos. El tiempo total de análisis cromatográfico fue de 20 minutos. En la Figura IV.7 se muestra un cromatograma obtenido mediante las condiciones establecidas en el programa de temperatura G.

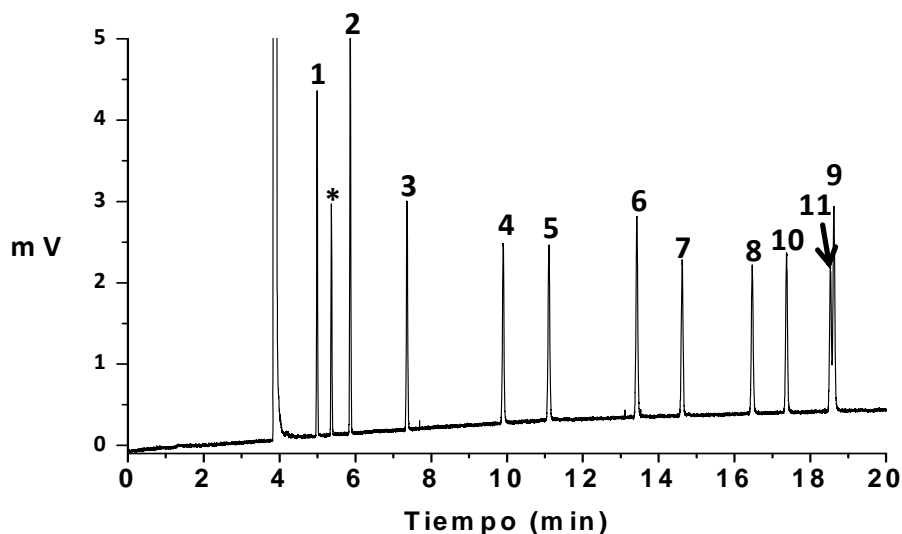


Figura IV.7.- Cromatograma obtenido para una mezcla de trece FAMES de concentración 100 µg mL⁻¹ disueltos en n-hexano, según el siguiente programa de temperatura (G): 1) 160 °C durante 1 min; 2) 170 °C durante 5 min (3 °C min⁻¹) y 3) 200 °C durante 2 min (3 °C min⁻¹). (*Patrón interno, de concentración 100 µg mL⁻¹).

El tiempo de análisis no permitió la identificación de los trece FAMES estudiados, debido a que el cromatograma finalizó antes de que eluyeran todos los analitos. Por otro lado, el metil linolenato (pico 9) y el metil eicosenoato (pico 11) aparecieron solapados nuevamente. Este programa de temperatura se descartó ya que no permitió la separación e identificación de los trece FAMES.

Por último, se detalla a continuación el programa de temperatura que se consideró óptimo para la separación de los trece FAMES por GC-FID (programa S de la Tabla IV.13). Inicialmente, la temperatura de la columna se mantuvo a 160 °C durante un minuto y después se aplicaron tres rampas de temperatura. En primer lugar, la temperatura se incrementó hasta 170 °C a razón de 8 °C min⁻¹, manteniéndose a esta temperatura durante 5 minutos. A continuación, se aplicó una rampa de temperatura de 30 °C min⁻¹ hasta alcanzar 200 °C, manteniéndose a esta temperatura durante 5 minutos. Finalmente, se alcanzaron 210 °C mediante una rampa de temperatura de 10 °C min⁻¹, manteniéndose durante los últimos 5 minutos del análisis. El tiempo total del análisis cromatográfico fue de 19,25 minutos, tiempo suficiente para permitir la correcta separación de todos los FAMES, con muy buenas

resoluciones para cada uno de ellos. Un cromatograma obtenido mediante este programa de temperatura se muestra en la Figura IV.8.

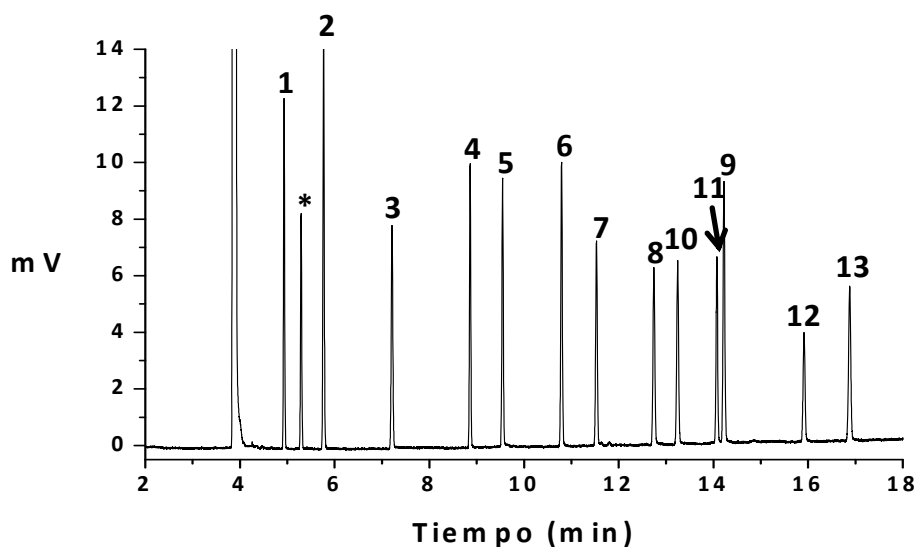


Figura IV.8.- Cromatograma obtenido para una mezcla de trece FAMES de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ disueltos en n-hexano, según el programa de temperatura óptimo (S): 1) $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min; 2) $170 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min ($8 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$); 3) $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min ($30 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$); y 4) $210 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min ($10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). (*Patrón interno, de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Como se puede observar, la separación conseguida bajo estas condiciones experimentales cromatográficas permitió llevar a cabo la determinación de los trece FAMES objeto de estudio, con una resolución satisfactoria y altas eficiencias de los picos, con un tiempo de análisis inferior a los 18 minutos. Por lo tanto, este programa de temperatura se estableció como óptimo para la separación de los trece FAMES en muestras de biodiesel.

En la Tabla IV.15 se resumen las condiciones óptimas de la metodología cromatográfica desarrollada para la determinación de los trece FAMES estudiados mediante GC-FID.

Tabla IV.15.- Condiciones experimentales optimizadas para la determinación de FAMES mediante GC-FID.

Sistema cromatográfico	
Columna analítica	CP-Sil 88 (Varian) WCOT Fused Silica (50 m, 0,25 mm D.I., 0,25 μm)
Temperatura del inyector	250 °C
Programa de temperatura del horno de la columna	1) 160 °C mantenido durante 1 min 2) 170 °C mantenido durante 5 min (8 °C min ⁻¹) 3) 200° C mantenido durante 5 min (30 °C min ⁻¹) 4) 210 °C mantenido durante 5 min (10 °C min ⁻¹)
Gas portador	Helio (1,0 mL min ⁻¹)
Gas "make up "	Nitrógeno (30 mL min ⁻¹)
Presión en cabeza de columna	28,1 psi
Volumen de inyección de muestra	0,1 μL
Modo de inyección	<i>Split</i> (relación 1:20)
Sistema de detección	
Detector	FID
Caudal de aire	400 mL min ⁻¹
Caudal de hidrógeno	30 mL min ⁻¹
Temperatura del detector	250 °C

En la Tabla IV.16 se muestran los tiempos de retención determinados para cada uno de los patrones de los FAMES analizados y sus correspondientes desviaciones estándar (s), realizando cinco determinaciones y siguiendo el programa de temperatura óptimo del método analítico desarrollado.

Tabla IV.16.- Tiempos de retención con sus correspondientes desviaciones estándar (s) obtenidos mediante las condiciones óptimas del método por GC-FID (n=5).

Pico	FAME	t_R (min)	s
1	C10:0	4,93	0,02
2	C12:0	5,77	0,03
3	C14:0	7,21	0,01
4	C16:0	8,91	0,01
5	C16:1	9,55	0,03
6	C18:0	10,79	0,02
7	C18:1	11,53	0,04
8	C18:2	12,74	0,06
9	C18:3	14,22	0,01
10	C20:0	13,24	0,03
11	C20:1	14,07	0,01
12	C22:0	15,91	0,03
13	C22:1	16,87	0,04

IV.7 Características analíticas del método cromatográfico optimizado

Una vez obtenido un método de separación adecuado para todos los FAMES estudiados, se estudiaron las características analíticas del método desarrollado a partir de las áreas relativas de pico, obtenidas a partir del método del patrón interno (cocientes entre las áreas de pico de cada analito y el área de pico del patrón interno). Las rectas de calibrado se obtuvieron inyectando, por triplicado, siete niveles diferentes de concentración de los patrones en el intervalo comprendido entre 0,5 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=7), utilizando una concentración de patrón interno de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (metil undecanoato). Las rectas de calibrado se sometieron a regresión lineal y se utilizó el coeficiente de correlación (r) como valor representativo de la linealidad.

En la Tabla IV.17 se muestran los principales parámetros de calidad del método cromatográfico desarrollado para cada uno de los trece FAMES objeto de estudio, como los parámetros de calibración del método (pendientes y sus desviaciones estándar ($b \pm S_b$) y ordenadas en el origen y sus desviaciones estándar ($a \pm S_a$)), los valores del error estándar de la estimación ($S_{y/x}$), los coeficientes de correlación (r) y los límites de detección y cuantificación (LD y LQ).

Los límites de detección y cuantificación (LD y LQ) fueron calculados del mismo modo anterior, a partir de tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de diez determinaciones de la disolución patrón de menor concentración empleada en el calibrado.

Tabla IV.17.- Características analíticas del método basado en GC-FID desarrollado para el análisis de los trece FAMEs estudiados. (t_R patrón interno = 5,30 min).

Pico	FAME	$(b \pm S_b^*) \cdot 10^{-3}$ (n=7) (cps mL μg^{-1})	$(a \pm S_a^*) \cdot 10^{-3}$ (n=7) (cps)	$S_{y/x}$	r	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	C10:0	11,5 \pm 0,3	99 \pm 1	0,1316	0,9992	136	453
2	C12:0	11,5 \pm 0,2	46 \pm 7	0,0967	0,9993	137	458
3	C14:0	10,7 \pm 0,4	141 \pm 11	0,1498	0,9990	138	460
4	C16:0	10,6 \pm 0,3	102 \pm 8	0,1091	0,9994	177	591
5	C16:1	10,2 \pm 0,2	81 \pm 8	0,0975	0,9993	164	547
6	C18:0	8,9 \pm 0,3	142 \pm 10	0,1265	0,9992	233	776
7	C18:1	9,2 \pm 0,3	77 \pm 9	0,1127	0,9994	202	674
8	C18:2	8,9 \pm 0,3	130 \pm 11	0,1360	0,9993	197	657
9	C18:3	8,6 \pm 0,1	70 \pm 4	0,0546	0,9992	154	515
10	C20:0	8,8 \pm 0,3	138 \pm 10	0,1234	0,9989	212	707
11	C20:1	9,3 \pm 0,3	94 \pm 9	0,1223	0,9993	133	443
12	C22:0	7,6 \pm 0,1	75 \pm 4	0,0570	0,9991	141	469
13	C22:1	7,8 \pm 0,2	92 \pm 6	0,0825	0,9994	175	583

*Intervalos de confianza (S_a y S_b) calculados al 95 % de nivel de confianza

Los resultados obtenidos mostraron que el método de análisis de FAMEs por GC-FID desarrollado presenta una buena linealidad en el rango de concentraciones estudiado, con coeficientes de correlación (r) superiores a 0,9989. Por otro lado, se observa que los límites de detección obtenidos se encontraron entre 133 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el metil eicosenoato y 233 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el metil estearato, mientras que los límites de cuantificación oscilaron entre 443 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el metil behenato y 776 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el metil estearato, lo que nos indica la validez del método para poder determinar y cuantificar los distintos FAMEs en muestras de biodiesel.

A continuación, se llevó a cabo el estudio de la reproducibilidad y la repetitibilidad del método desarrollado. La precisión del método, expresada como porcentaje de la desviación estándar relativa (% RSD), se determinó realizando tres inyecciones consecutivas bajo las condiciones óptimas del método cromatográfico durante el mismo día ($n=3$) y en tres días diferentes ($n=9$) a tres niveles de concentración diferentes (5, 25 y 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de una mezcla de patrones de FAMEs. La Tabla IV.18 muestra los parámetros de validación del método para una concentración de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose resultados muy similares para los otros dos niveles de concentración estudiados.

Tabla IV.18.- Precisión en un mismo día y entre días, expresado como % RSD, para los tiempos de retención y áreas de pico para una concentración de 25 µg mL⁻¹.

Pico	FAME	Precisión en un mismo día (% RSD; n=3)		Precisión entre días (% RSD; n=9)	
		t _r	Área	t _r	Área
1	C10:0	0,03	1,9	0,07	3,0
2	C12:0	0,03	2,5	0,10	5,1
3	C14:0	0,04	2,6	0,13	5,5
4	C16:0	0,05	2,2	0,07	4,6
5	C16:1	0,05	2,1	0,07	7,2
6	C18:0	0,05	3,5	0,11	7,3
7	C18:1	0,04	3,7	0,12	6,6
8	C18:2	0,05	2,8	0,08	7,7
9	C18:3	0,05	3,0	0,13	5,0
10	C20:0	0,04	3,9	0,07	4,8
11	C20:1	0,04	3,1	0,09	6,7
12	C22:0	0,05	1,9	0,10	5,6
13	C22:1	0,05	2,8	0,10	5,1

Como puede apreciarse, los % RSD fueron menores del 0,05 % para los tiempos de retención e inferiores al 3,9 % para las áreas de pico, en lo que respecta a la precisión en un mismo día (repetitibilidad). En relación a la precisión entre días (reproducibilidad), los estudios realizados mostraron % RSD inferiores a 0,13 % y 7,7 % para los tiempos de retención y áreas de pico, respectivamente. A partir de estos resultados, se puede concluir que el método cromatográfico desarrollado es reproducible en las condiciones señaladas. La eficacia del método fue calculada utilizando la función *Suitability* del programa Star Chromatography. Los valores obtenidos se encontraron comprendidos entre 1.053.212 NTP m⁻¹ (número de platos teóricos por metro) para el metil caprato y 8.215.693 NTP m⁻¹ para el metil behenato.

Por último, se evaluó la exactitud del método a través de un estudio de recuperación de los trece FAMES, el cual se realizó mediante la adición de cantidades conocidas y diferentes de cada uno de los patrones de FAMES a la muestra de biodiesel de aceite de girasol sin usar. La exactitud se evaluó a partir del porcentaje de recuperación de la cantidad adicionada de cada uno de los FAMES a una muestra de biodiesel según la siguiente ecuación:

$$R (\%) = \frac{X_2 - X_1}{X_{añadida}} \cdot 100$$

donde:

- X₂: cantidad de FAME obtenida en la muestra de biodiesel enriquecida
- X₁: cantidad de FAME obtenida en la muestra sin enriquecer
- X_{añadida}: cantidad de FAME añadida a la muestra

En la Tabla IV.19 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada concentración de FAME añadido junto con sus % RSD.

Tabla IV.19.- Recuperaciones, expresadas como % (media \pm desviación estándar, n = 3), y % RSD obtenidos para las trece FAMEs estudiados.

Pico	FAME	Recuperación (%)	% RSD
1	C10:0	98,3	1,8
2	C12:0	97,6	2,0
3	C14:0	98,8	2,4
4	C16:0	99,2	2,1
5	C16:1	97,4	2,4
6	C18:0	100,9	1,0
7	C18:1	98,2	1,3
8	C18:2	102,2	1,0
9	C18:3	100,3	1,9
10	C20:0	99,5	2,6
11	C20:1	98,6	2,2
12	C22:0	97,7	1,9
13	C22:1	100,6	1,5

En general, se obtuvieron recuperaciones satisfactorias, comprendidas entre 97,4 % para el metil palmitoleato y 102,2 % para el metil linoleato, con % RSD inferiores a 2,6 %, demostrando que el método propuesto era adecuado para la determinación de FAMEs en muestras de biodiesel.

La Figura IV.9 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de biodiesel no enriquecida (Figura IV.9.A) y enriquecida con una concentración diferente de cada uno de los FAMEs (Figura IV.9.B).

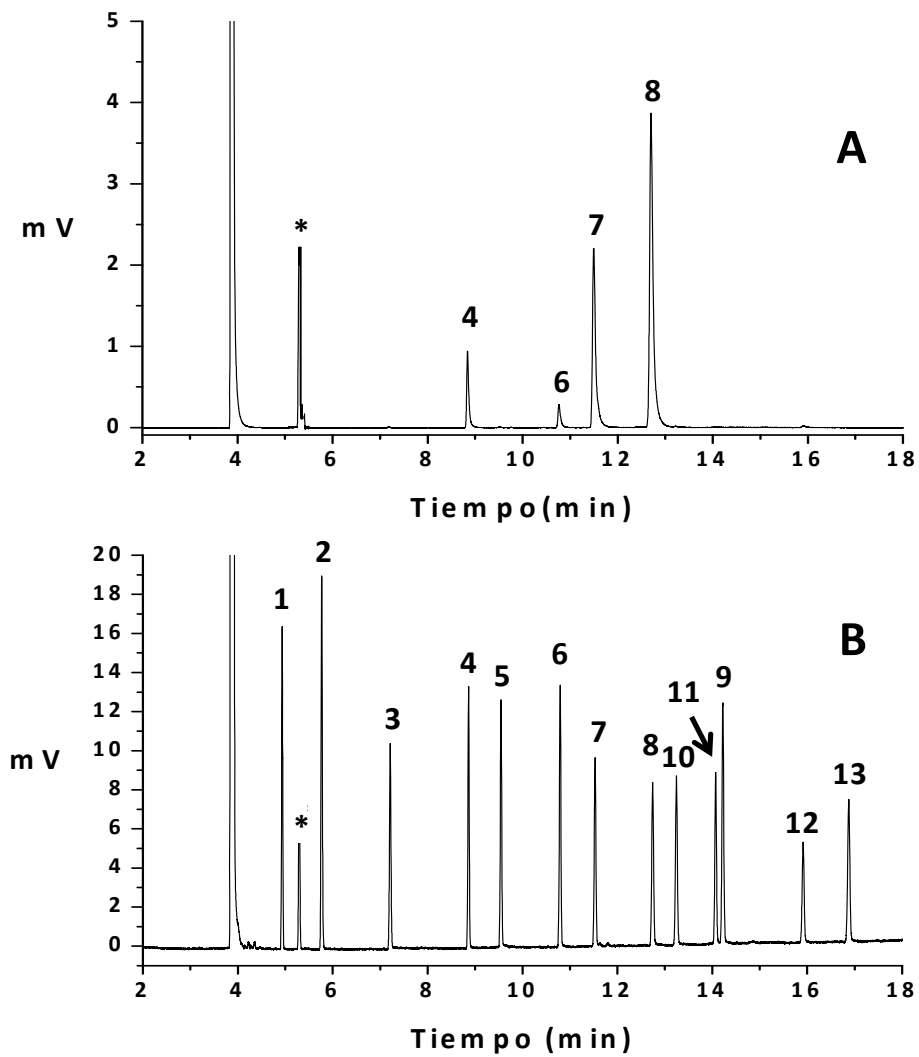


Figura IV.9.- Cromatograma obtenido a partir del método optimizado GC-FID para una muestra de biodiesel (A) sin enriquecer con los FAMES y (B) enriquecido con diferentes concentraciones de FAMES.

Como puede apreciarse en el cromatograma correspondiente a la muestra de biodiesel no enriquecida (Figura IV.9.A), aparecen señales de cuatro FAMES (metil palmitato (4), metil estearato (6), metil oleato (7) y metil linoleato (8)). Asimismo, en el cromatograma de la muestra enriquecida (Figura IV.9.B) se observa que los trece FAMES objeto de estudio pudieron ser determinados en una muestra real de biodiesel empleando la metodología desarrollada.

IV.8 Aplicación de la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME) a muestras de biodiesel

IV.8.1 Aplicación de la extracción en fase sólida (SPE)

Con objeto de extraer los FAMES presentes en la matriz de la muestra de biodiesel, sin necesidad de introducir en la columna cromatográfica una variedad de compuestos que pudieran deteriorar la misma en un breve espacio de tiempo, provocando sangrados finales en los cromatogramas, se desarrolló un método de preconcentración *off-line* basado en la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE), que permitiera disminuir las posibles interferencias en el análisis de FAMES por GC-FID debidas a la matriz de la muestra de biodiesel, así como para incrementar la sensibilidad de la separación cromatográfica optimizada. La SPE es una técnica de preconcentración y tratamiento de muestras que constituye un método de aislamiento y purificación de compuestos químicos presentes en matrices complejas, siendo un sistema relativamente rápido y bastante reproducible. Se ha aplicado como técnica de purificación de muestras, enriquecimiento de trazas y como un procedimiento rápido de separación.

Se estudiaron dos tipos de cartuchos para la extracción de muestras de biodiesel por SPE: Oasis-HLB y Sep-Pak-Plus. Se ensayaron distintas condiciones para la activación y secado de los cartuchos, así como para la elución de los FAMES retenidos, con objeto de obtener el máximo porcentaje para cada uno de los FAMES estudiados, obteniéndose diferentes condiciones óptimas para cada cartucho de SPE estudiado. En ambos casos la elución de los FAMES retenidos en el cartucho de SPE se llevó a cabo con una mezcla de éter de petróleo y dietil-éter (9:1, v/v), utilizando 15 y 20 mL de dicha mezcla, respectivamente.

Los resultados obtenidos, mediante el método cromatográfico optimizado, para los dos tipos de cartuchos de SPE estudiados se muestran en la Figura IV.10.

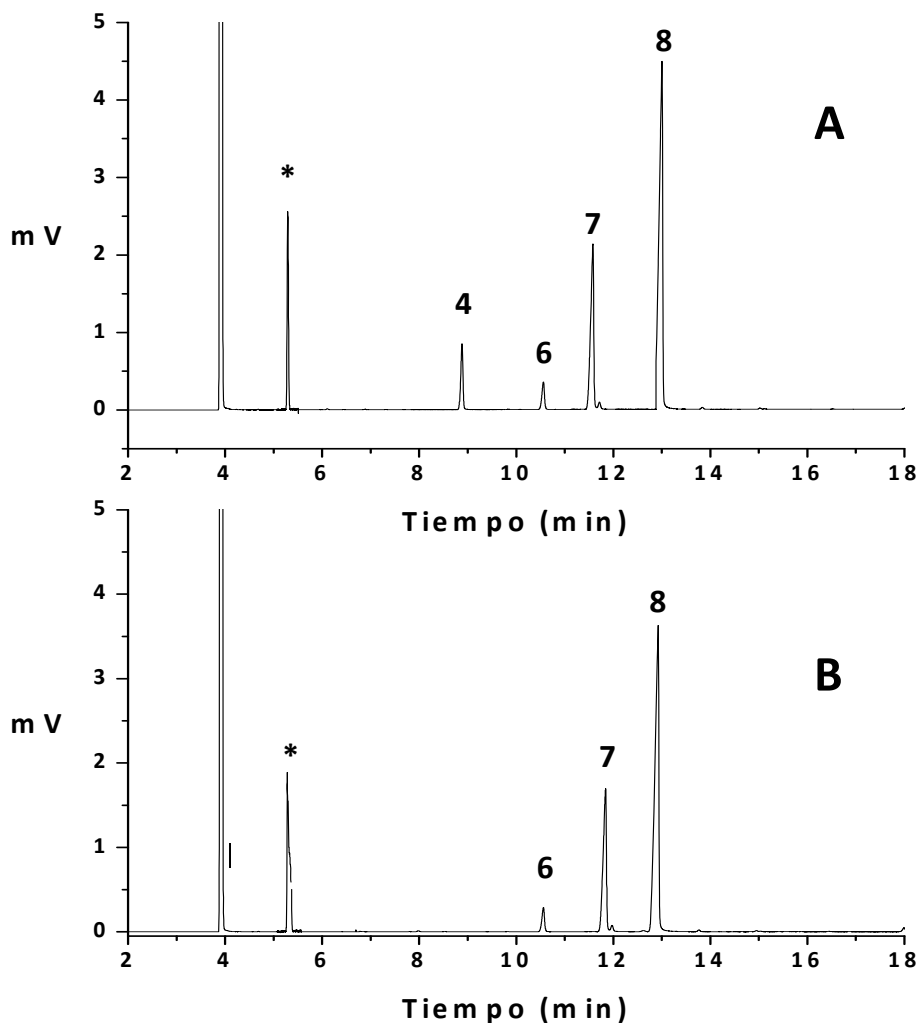


Figura IV.10.- Cromatograma obtenido para una muestra de biodiesel extraída con un cartucho Sep-Pak-Plus (A) y extraída con un cartucho Oasis-HLB (B). (*Patrón interno, de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Como se puede observar, el cartucho de SPE que proporcionó los mejores resultados para la muestra de biodiesel analizada (Figura IV.10.A) fue el cartucho Sep-Pak-Plus, ya que los porcentajes de FAMEs obtenidos después de extraer la muestra con este cartucho fueron superiores a los obtenidos con el Oasis-HLB. Además se observa que el pico 4, correspondiente al metil palmitato, no pudo ser extraído mediante el cartucho Oasis-HLB. Por otro lado, se observa que la intensidad correspondiente a cada pico cromatográfico obtenido con este cartucho disminuyó en relación a la obtenida con el Sep-Pak-Plus.

IV.8.2 Aplicación de la microextracción en fase sólida (SPME)

Se desarrolló un método de microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) en muestras de biodiesel, con objeto de mejorar los resultados obtenidos mediante SPE desde el punto de vista de porcentajes de FAMEs extraídos. La SPME es una técnica de preparación de muestras desarrollada en 1990 por Arthur y Pawliszyn en la Universidad de Waterloo (Ontario, Canadá) para el análisis de compuestos orgánicos (Arthur y Pawliszyn, 1990), habiéndose convertido en una técnica rutinaria en muchos laboratorios. Se desarrolló para facilitar la preparación de muestras tanto en el laboratorio como en el lugar de muestreo y está basada en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida químicamente inerte, estable a altas temperaturas y recubierta de un material adsorbente, en la mayoría de los casos, de naturaleza polimérica. La fibra se expone a la muestra acuosa o gaseosa que se quiere analizar hasta que se establece el equilibrio entre el analito en la muestra y en la fibra. Posteriormente, el analito es desorbido de la fibra utilizando una temperatura elevada o un disolvente orgánico.

Se utilizó un dispositivo SPME para extracción manual y se estudiaron varias fibras no modificadas químicamente. Las fibras de SPME empleadas fueron fibras con recubrimiento de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65 μm de espesor, polidimetilsiloxano (PDMS) de 30 μm de espesor, y poliacrilato (PA) de 85 μm de espesor. La afinidad de la fibra por el analito es función de la polaridad de ambos. En general, los recubrimientos polares, como las fibras de PA, permiten extraer analitos polares, mientras que fibras apolares, como las de PDMS y las de PDMS-DVB son apropiadas para la extracción de analitos apolares. Inicialmente, cabe pensar que las fibras de PDMS-DVB y PDMS permiten extraer los FAMEs de las muestras de biodiesel, dada su similar polaridad, aunque se empleó una fibra polar (PA) para evaluar su posible empleo. Los resultados obtenidos para los tres tipos de fibras de SPME empleadas se muestran en la Figura IV.11.

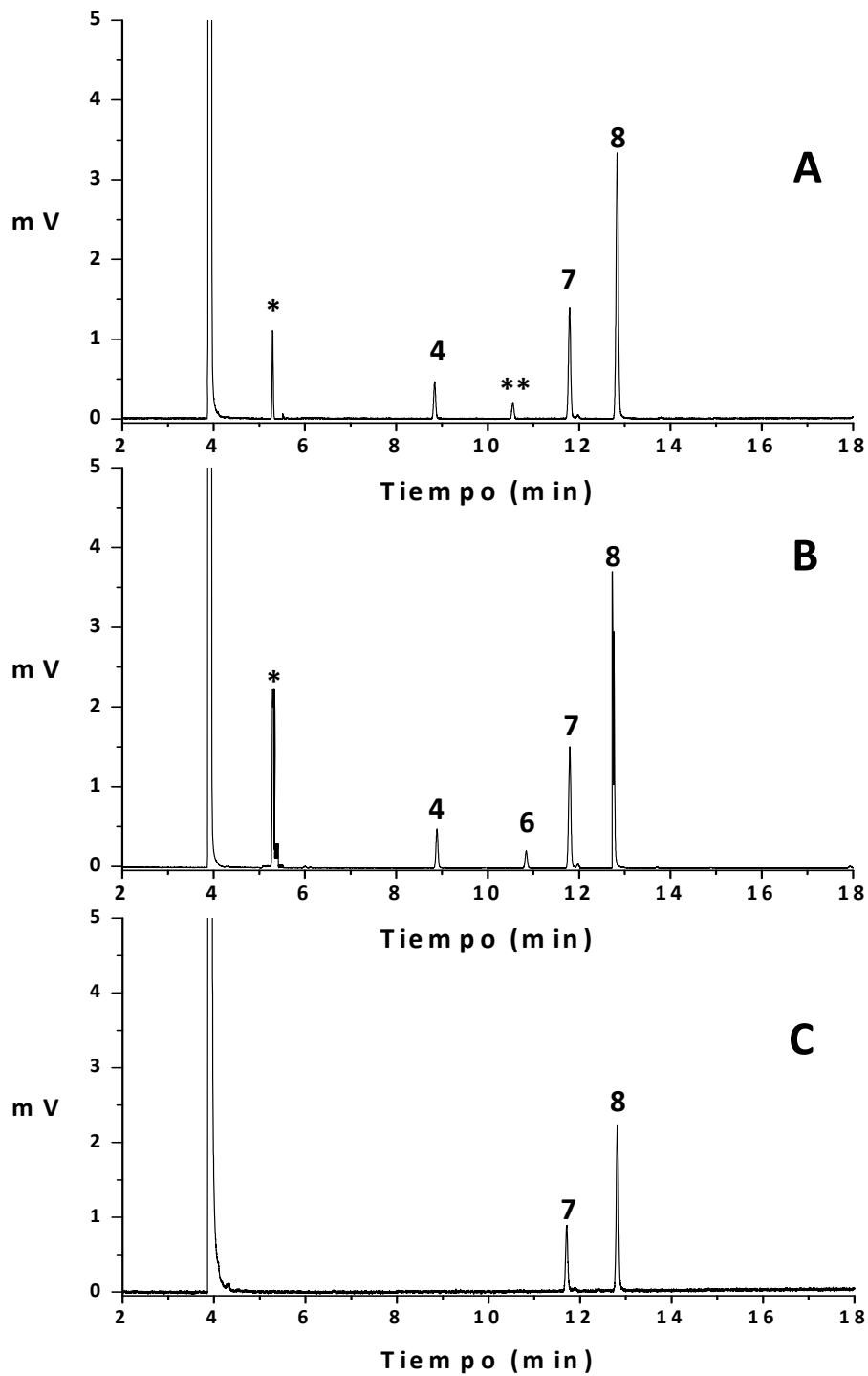


Figura IV.11.- Cromatograma obtenido para una muestra de biodiesel extraída con una fibra de PDMS-DVB (A); extraída con una fibra de PDMS (B) y extraída con una fibra de PA (C). (*Patrón interno, de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; **Pico no identificado).

Como se puede observar en la figura anterior, en el cromatograma correspondiente a la muestra extraída con una fibra de PDMS (Figura IV.11.B) aparecen las señales correspondientes a los cuatro FAMES presentes en la muestra no extraída (Figura IV.9.A), que son metil palmitato (4), metil estearato (6), metil oleato (7) y metil linoleato (8), obteniéndose buenas intensidades para cada uno de ellos. Sin embargo, en el cromatograma correspondiente a la muestra extraída con una fibra de PDMS-DVB (Figura IV.11.A) sólo aparecen las señales correspondientes a tres de los cuatro FAMES, además de la señal de una especie que no pudo ser identificada (**). Por último, y como era de esperar, en el cromatograma correspondiente a la muestra extraída con una fibra de PA (Figura IV.11.C), sólo aparecen las señales correspondientes a dos de los cuatro FAMES, obteniéndose bajas intensidades de la señal de ambos. Se observa que ni el patrón interno pudo ser extraído mediante el uso de la fibra de PA.

A la vista de las Figuras IV.10 y IV.11, se puede concluir que el empleo del cartucho Sep-Pak-Plus de SPE y de la fibra de PDMS de SPME ha proporcionado los mejores resultados, desde el punto de vista de porcentajes de FAMES extraídos. No obstante, los métodos de preconcentración basados en SPE y en SPME ensayados no fueron aplicados en experimentos posteriores, ya que los resultados obtenidos fueron similares a los alcanzados mediante la inyección directa de la muestra de biodiesel, diluidas en n-hexano (factor de dilución=16), en el sistema cromatográfico, como puede observarse en la Figura IV.9.A. Por lo tanto, el empleo de SPE y de SPME, fue descartado debido a que no se conseguían mejoras significativas en el porcentaje de FAMES obtenido y por el elevado tiempo empleado durante el proceso de extracción.

IV.9 Conclusiones

- Se ha desarrollado una nueva metodología analítica para la determinación simultánea de trece FAMES (metil caprato, metil laurato, metil miristato, metil palmitato, metil palmitoleato, metil estearato, metil oleato, metil linoleato, metil linolenato, metil araquidato, metil eicosenoato, metil behenato y metil erucato) en muestras de biodiesel mediante GC-FID.

- Las mejores condiciones para la separación cromatográfica fueron obtenidas haciendo uso de un programa de temperatura constituido por cuatro etapas: 1) 160 °C durante 1 min, 2) 170 °C durante 5 min, a razón de 3 °C min⁻¹, 3) 200 °C durante 5 min, a una velocidad de 30 °C min⁻¹, y 4) 210 °C durante 5 min, a una velocidad de 10 °C min⁻¹. El tiempo total del programa fue de 19 minutos y el tiempo de análisis fue inferior a los 17 minutos.

- El método GC-FID desarrollado permitió la separación de los trece FAMES objeto de estudio, proporcionando buenos resultados en términos de resolución, eficacia, tiempos de análisis y sensibilidad, permitiendo obtener límites de detección comprendidos entre 133 y 233 µg L⁻¹, lo cual representa una mejora considerable para este tipo de análisis.

● El tiempo de análisis obtenido en la metodología desarrollada mediante GC-FID es inferior al recogido en la normativa europea UNE-EN 14103:2003 y al propuesto por otros autores, Yuan *et al.* (2008) y Meng *et al.* (2008), con tiempos de análisis de 25; 42,73 y 71 minutos, respectivamente, lo que representa una mejora significativa para el análisis de este tipo de muestras, pudiéndose emplear para el control de calidad del biodiesel.

● La validación del método analítico desarrollado mostró que dicho método presenta una buena precisión, exactitud, selectividad e intervalo dinámico de linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

● Con objeto de minimizar o eliminar las posibles interferencias en el análisis de los FAMES por GC-FID, asociadas a la matriz de la muestra de biodiesel, así como para preservar la durabilidad de la columna cromatográfica, se ensayó una metodología de SPE y de SPME. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios desde el punto de vista de la inyección de muestra, aunque no condujeron a una mejora en el porcentaje de FAMES extraídos, por lo que se descartó su empleo en futuros experimentos.

CAPÍTULO V



**OPTIMIZACIÓN DE LA
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A
PARTIR DE CATÁLISIS
HOMOGÉNEA MEDIANTE EL
EMPLEO DE LA METODOLOGÍA DE
SUPERFICIES DE RESPUESTA.
DETERMINACIÓN DEL
CONTENIDO DE FAMES EN
MUESTRAS DE BIODIESEL**

En este capítulo se presenta la optimización de los principales parámetros que influyen en la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales tanto sin usar como procedentes de procesos de fritura. Inicialmente, se optimizaron los parámetros físicos que afectan a la reacción, como son tiempo de reacción, velocidad de agitación y condiciones de las etapas de lavado y secado. A continuación, aplicando la metodología del diseño factorial de experimentos y las superficies de respuesta, se obtuvieron los valores óptimos de los principales parámetros que afectan a la reacción de transesterificación, que son la temperatura de reacción, la concentración de catalizador y la relación molar metanol-aceite, con objeto de obtener el máximo porcentaje de FAMES para las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceites vegetales sin usa. Además, el método optimizado se aplicó a la producción de biodiesel a partir de aceites procedentes de procesos de fritura, siendo necesario un pre-tratamiento de las muestras consistente en la deshidratación con sulfato magnésico ($MgSO_4$) y posterior filtrado a vacío para eliminar la humedad presente en este tipo de aceites y disminuir el porcentaje de FFA presentes. El procedimiento optimizado permitió obtener biodiesel con elevados porcentajes de FAMES, que verifican la normativa europea UNE-EN 14214:2009.

V.1 Antecedentes

Son numerosos los trabajos de investigación que se han desarrollado para la obtención de biodiesel, aprovechando una gran variedad de materias primas grasas y empleando distintos métodos para su fabricación, llegando a producirse a escala industrial en diversos países por ser un carburante ecológico que posee grandes ventajas medioambientales. El procedimiento para la elaboración del biodiesel es un proceso bien conocido, existiendo varios tipos de catálisis para llevar a cabo la reacción de transesterificación para la producción de alquilésteres a partir de aceites vegetales, grasas animales y algas.

La técnica más utilizada a nivel industrial para la producción de biodiesel es la transesterificación, ácida o alcalina, mediante catálisis homogénea. Sin embargo, existen otros procesos de obtención de biodiesel que aún se encuentran en fase de desarrollo para poder ser implantadas en la industria de los biocombustibles, como pueden ser:

- Transesterificación con catalizadores heterogéneos, como zeolitas, alúmina, óxidos metálicos, etc
- Transesterificación con catalizadores enzimáticos
- Transesterificación en condiciones supercríticas no catalítica con metanol

La mayor parte del biodiesel producido actualmente por la industria se realiza mediante la reacción de transesterificación con catálisis homogénea, utilizando bases fuertes como catalizadores (Brito *et al.*, 2004; Mittelbach *et al.*, 2004; Izquierdo Herrera, 2006; Agarwal, 2007; Martín Andara, 2008; Moser, 2009; Trujillo Hernández, 2009). De esta forma, la reacción es más rápida y más beneficiosa económicamente, en comparación con la catálisis homogénea ácida o la heterogénea, debido a las siguientes razones:

- Las condiciones operativas de presión y temperatura son moderadas
- Se requieren pequeños volúmenes de alcohol, lo que se traduce en reactores más pequeños y económicos
- Los rendimientos de conversión son elevados (hasta un 98 %), con tiempos de reacción relativamente cortos y pocas reacciones secundarias
- La conversión al producto final es directa, en una sola etapa de reacción
- Es posible la utilización de materiales convencionales, como el acero al carbono, para la construcción de los reactores y tanques de almacenamiento, debido a la baja agresividad química de los reactivos empleados

Sin embargo, la aplicación de la catálisis homogénea requiere una materia prima de alta calidad, es decir, aceites con una baja concentración de FFA, sin gomas ni impurezas. También es indispensable que su humedad sea mínima, ya que de lo contrario se pueden originar reacciones secundarias de saponificación o neutralización, con la consecuente producción de nuevos FFA (Knothe *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2008; Benjumea *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010). La neutralización de estos ácidos se puede evitar mediante la utilización de

aceites con bajo índice de acidez. Sin embargo, en muchas ocasiones los aceites más rentables económicamente presentan un cierto contenido en FFA, como son los aceites vegetales o grasas provenientes de procesos de fritura recogidas en cafeterías, restaurantes, industrias alimentarias e incluso a nivel doméstico.

El proceso de obtención de biodiesel mediante transesterificación alcalina consta principalmente de las siguientes etapas:

- **Mezcla del alcohol y del catalizador.** La base empleada como catalizador se disuelve en el alcohol con ayuda de agitación para, posteriormente, mezclarse con el aceite. La reacción de mezcla de los reactivos es exotérmica.
- **Reacción de transesterificación.** La combinación alcohol-catalizador y el aceite se mezclan con ayuda de agitación mecánica para facilitar el contacto íntimo entre los reactivos teniendo lugar la reacción de transesterificación. Aplicando la catálisis homogénea, esta reacción se lleva a cabo a una temperatura determinada y, generalmente, a presión atmosférica.
- **Separación.** El producto de la reacción consiste en una mezcla de dos fases compuestas por glicerina y biodiesel, que se separan mediante decantación.
- **Lavado del biodiesel.** El biodiesel se lava con agua acidulada para eliminar los residuos de metanol y jabones formados, así como neutralizar los restos del catalizador que no hayan reaccionado. Finalmente, se lava con agua destilada para eliminar los restos del ácido del agua de lavado.
- **Secado del biodiesel.** El biodiesel se seca para eliminar los restos de agua y de otros reactivos que no hayan sido eliminados durante las etapas de lavado. El secado se realiza durante un tiempo y temperatura determinada en un evaporador centrífugo.

En la Figura V.1 se muestra un esquema del procedimiento general seguido para la obtención de biodiesel descrito anteriormente.

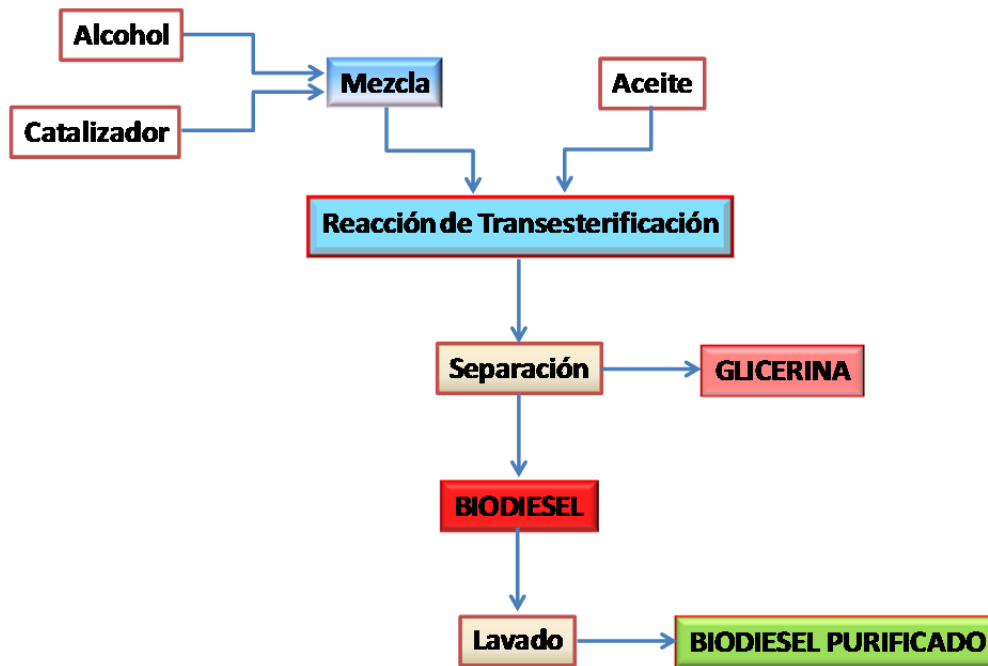


Figura V.1.- Esquema general del proceso de obtención de biodiesel mediante la reacción de transesterificación de aceites.

La reacción de transesterificación alcalina es un proceso que se debe optimizar para que el costo de producción del biodiesel sea lo menor posible, de forma que sea competitivo con los precios del diésel de petróleo, pero que a la vez cumpla con las especificaciones europeas de calidad (UNE-EN 14214:2009) para su utilización como combustible en motores diésel (Knothe *et al.*, 2005; Mosser, 2009). La reacción de transesterificación depende, principalmente, de los siguientes factores:

- Naturaleza de la materia prima (aceite), humedad y contenido en FFA
- Temperatura, presión y tiempo de reacción
- Relación molar alcohol-aceite
- Concentración de catalizador
- Velocidad de agitación durante la reacción

Existe una gran variabilidad en la bibliografía respecto a las condiciones óptimas para realizar la reacción de transesterificación mediante catálisis homogénea alcalina, incluso utilizando un mismo tipo de aceite como materia prima. En la Tabla V.1 se muestra un resumen de las condiciones óptimas para la reacción de transesterificación con catálisis homogénea alcalina, en función de diversos tipos de aceites.

Tabla V.1.- Resumen de las condiciones óptimas para la reacción de transesterificación por catálisis homogénea alcalina.

Tipo de aceite	Relación molar (metanol-aceite)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Velocidad agitación (rpm)	Catalizador		Referencia
					Tipo	% (m/m)	
Coco, palma, salvado de arroz y semillas de sésamo	6:1	50	90	-	NaOH	1,5	Evera <i>et al.</i> , 2009
Semillas de algodón, <i>Pongamia pinnata</i> y <i>Azadirachta indica</i>	7:1	50	90	-	NaOH	1,5	Evera <i>et al.</i> , 2009
Semillas de algodón	6:1	65	90	600	NaOH	0,75	Rashid <i>et al.</i> , 2009
Salvado de arroz	9:1	55	60	1100	NaOH	0,75	Sinha <i>et al.</i> , 2008
Semillas de algodón, girasol	6:1	60	60	400	NaOH	1,0	Keera <i>et al.</i> , 2011
Girasol	3:1	70	-	-	KOH	0,28	Antolin <i>et al.</i> , 2002
Girasol	6:1	25	60	600	KOH	1,3	Vicente <i>et al.</i> , 2007a
Girasol	6:1	60	120	600	NaOH	1,0	Rashid <i>et al.</i> , 2008
Oliva, girasol y soja	6:1	60	60	800	NaOH	0,6	Dias <i>et al.</i> , 2008
Fritura, girasol	6:1	25	30	700	KOH	1,0	Tomasevic <i>et al.</i> , 2003
Fritura	6:1	45	60	700	KOH	1,5	Bautista <i>et al.</i> , 2009
Fritura	6:1	65	60	-	KOH	1,0	Reefat <i>et al.</i> , 2008
Fritura	7:1	60	20	800	NaOH	1,1	Leung <i>et al.</i> , 2006
Fritura	6:1	50	90	500	NaOH	1,0	Meng <i>et al.</i> , 2008
Fritura	7:1	30	80	-	KOH	0,75	Phan <i>et al.</i> , 2008
Fritura	6:1	60	60	800	NaOH	0,8	Dias <i>et al.</i> , 2008
<i>Pongamia pinnata</i>	6:1	65	180	360	KOH	1,0	Meher <i>et al.</i> , 2006b
<i>Madhuca indica</i>	6:1	60	30	-	KOH	0,7	Ghadge <i>et al.</i> , 2006
<i>Brassica carinata</i>	6:1	25	60	600	KOH	1,2-1,5	Vicente <i>et al.</i> , 2005
<i>Croton megalocarpus</i>	3:1	60	60	400	KOH	1,0	Kafuku <i>et al.</i> , 2010
Manteca de cerdo	6:1	65	20	-	KOH	1,26	Jeong <i>et al.</i> , 2009
Colza	6:1	50	90	600	KOH	0,6	Ferella <i>et al.</i> , 2010
Colza	6:1	45	60	800	NaOH	1,0	Leung <i>et al.</i> , 2010

Cuando se utilizan aceites procedentes de procesos de fritura como materia prima, algunos autores proponen una preesterificación ácida, principalmente con ácido sulfúrico, previa a la reacción de transesterificación, con el objetivo de eliminar los FFA presentes en estos tipos de aceites (Cvengros *et al.*, 2004; Encinar *et al.*, 2005; Marchetti *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Esto es debido a que cuando un aceite se somete a un proceso de calentamiento prolongado y repetido en el tiempo, a la vez que el aceite entra en contacto con el agua presente en los alimentos sometidos a fritura, se produce la hidrólisis de los triglicéridos presentes en el aceite, provocando un aumento en el contenido en FFA, que afectan negativamente a la reacción de transesterificación (Marmesat *et al.*, 2007; Enweremadu *et al.*, 2009). Otros autores proponen agregar la cantidad adecuada de catalizador para neutralizar los FFA, ya que el exceso o la escasez de catalizador puede ocasionar la formación de jabones (Fukuda *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2008; Balat *et al.*, 2010).

Cvengros *et al.* (2004) determinaron que para disminuir el contenido de FFA en los aceites de fritura es suficiente someterlos a un proceso en el que la materia prima se calienta a 60 °C, luego se lava con agua caliente a 90 °C y finalmente se somete a una destilación a vacío. La cantidad de agua necesaria es un 5 % con respecto a la cantidad de aceite de fritura utilizada. De esta forma se consigue disminuir la acidez, el índice de peróxidos y el contenido en agua de los aceites de fritura, ya que ésta se evapora durante el tratamiento final. Otros autores (Chhetri *et al.*, 2008; Arquiza *et al.*, 2009; Atadashi *et al.*, 2009) consideran que no es necesaria esta preesterificación siempre y cuando los reactivos empleados se utilicen en las cantidades necesarias para neutralizar los FFA empleando un catalizador en exceso pero evitando la formación de jabones.

Con respecto al catalizador, algunos autores consideran que el mejor catalizador para realizar la reacción de transesterificación de aceites de fritura es el hidróxido potásico (Lowe *et al.*, 1998; Tomasevic *et al.*, 2003; Dorado *et al.*, 2004; Encinar *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2007; Allawzi *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2008; Reefat *et al.*, 2008), mientras que otros autores afirman que el catalizador que proporciona los mejores resultados en cuanto al porcentaje de FAMES es el hidróxido sódico (Reed *et al.*, 1992; Felizardo *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006a; Çaylı *et al.*, 2008; Chhetri *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2008; Arquiza *et al.*, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Keera *et al.*, 2011). Leung *et al.* (2006a) analizaron el porcentaje de FAMES obtenido utilizando NaOH y KOH como catalizador en la reacción de transesterificación de aceites de fritura y observaron que, aunque la tendencia de ambos catalizadores era similar en cuanto a la conversión de triglicéridos a FAMES, el catalizador que mejores resultados proporcionó era el NaOH. Las condiciones de temperatura, presión y relación molar metanol-aceite son semejantes empleándose KOH o NaOH como catalizadores. La concentración de catalizador más frecuentemente encontradas en la bibliografía varían desde 0,4 % hasta 1,5 % (m/m).

La relación molar metanol-aceite es uno de los parámetros más importantes que afectan al porcentaje de FAMES obtenidos en el proceso de producción del biodiesel. Según la

bibliografía, el valor de este parámetro puede variar desde 3:1 (valor estequiométrico) hasta 250:1 o valores superiores cuando se emplean catalizadores ácidos en la reacción de transesterificación (Ma *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2006). Mediante catálisis homogénea básica, una relación molar elevada afecta negativamente al proceso de separación de la glicerina, debido al aumento en la solubilidad de ésta en el metanol, lo que origina la hidrólisis de los FAMES para formar triglicéridos, disminuyendo el porcentaje de FAMES obtenido en la reacción de transesterificación (Banerjee *et al.*, 2009). Según la bibliografía, la relación molar metanol-aceite más empleada es 6:1, por proporcionar los mayores porcentajes de FAMES (Leung *et al.*, 2006a, 2010; Rashid *et al.*, 2009; Klofutar *et al.*, 2010; Keera *et al.*, 2011).

Otro factor ampliamente estudiado en los procesos de optimización de la producción del biodiesel es la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de transesterificación. Algunos autores han establecido una temperatura óptima de reacción de 25 °C, es decir, a temperatura ambiente, pero aumentando considerablemente el tiempo de reacción (Tomasevic *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2006a), mientras que otros autores han obtenido elevados porcentajes de FAMES realizando la reacción a 65 °C, es decir, a la temperatura de ebullición del metanol, con tiempos de reacción relativamente cortos (Karaosmanoğlu *et al.*, 1996; Vicente *et al.*, 2005; Felizardo *et al.*, 2006; Meher *et al.*, 2006a, 2006b; Wang *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2009, Leung *et al.*, 2010).

Por todo lo expuesto, la optimización del proceso de producción del biodiesel debe realizarse inicialmente, con objeto de determinar los valores óptimos de las variables que afectan al proceso y estandarizar el método de producción de biodiesel para el aceite empleado.

V.2 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos permite optimizar las condiciones de operación de un proceso, para conseguir que opere en las mejores condiciones y de forma robusta, entendiendo ésta como la reducción de la variabilidad del proceso. Básicamente, un proceso de optimización consta de tres etapas:

1.- *Selección de una función objeto.* Se trata de seleccionar aquel criterio o variable que se pretende optimizar, ya sea maximizar o minimizar. Frecuentemente, dicha variable suele ser la señal analítica o el tiempo de análisis. En casos más complicados, sin embargo, se idean una serie de funciones objeto generadas por combinación varios criterios, como pueden ser la selectividad, sensibilidad, precisión, etc. Esta función también se denomina función respuesta.

2.- *Selección de los factores más importantes.* Se puede realizar aplicando un diseño experimental de *screening* que, mediante la determinación de los efectos de los factores y de su influencia en la respuesta medida, permite determinar cuáles son los factores que realmente influyen en el resultado de la reacción de transesterificación.

3.- *Optimización.* Se trata de encontrar la combinación de factores que maximice o minimice la función objeto. Para ello, puede distinguirse entre optimización simultánea o secuencial. En la primera, la relación entre la respuesta y los factores se obtiene llevando a cabo un diseño experimental, construyendo un modelo matemático e investigando a través de este modelo la relación entre las variables. Por otro lado, la optimización secuencial se basa en un diseño de experimentos inicial, seguido de otros experimentos llevados a cabo en una cierta dirección que será función de esos experimentos iniciales. No se trata de buscar la relación existente entre la respuesta y los factores, sino que la superficie de respuesta se busca realizando experimentos en una cierta dirección.

Un buen método de optimización tiene dos cualidades importantes: produce un conjunto de condiciones experimentales que proporcionan la respuesta máxima o, al menos, una respuesta que sea próxima a la óptima, y lo hace así con el menor número posible de etapas experimentales de ensayo. En la práctica, la velocidad y conveniencia del procedimiento de optimización resultan extremadamente importantes, pudiendo ser suficiente en algunos casos utilizar un método que alcance, de manera razonable, un valor próximo al óptimo en un número pequeño de etapas.

V.2.1 Optimización secuencial del proceso de obtención del biodiesel

Con objeto de optimizar la producción de FAMES mediante catálisis homogénea, y debido al elevado número de variables que influyen en el proceso de obtención de biodiesel, se realizaron una serie de estudios previos para evaluar la influencia de los siguientes parámetros sobre la obtención de FAMES:

- Tipo de catalizador y alcohol
- Tiempo de reacción
- Velocidad de agitación durante la reacción de transesterificación
- Tiempo de decantación para separar los productos de la reacción de transesterificación
- Número de lavados y concentración de ácido fosfórico en las aguas de lavado
- Tiempo de decantación entre lavados para separar el agua de lavado del biodiesel
- Temperatura y tiempo de evaporación de las muestras de biodiesel en el evaporador centrífugo, para eliminar los restos de metanol y agua presentes en el biodiesel

Todas las experiencias se realizaron utilizando aceite de girasol sin usar como materia prima.

V.2.1.1 Selección del tipo de catalizador y de alcohol

Como ya se ha comentado anteriormente, de los tres grandes grupos de catalizadores (homogéneos, heterogéneos y enzimáticos) que se pueden utilizar en el proceso de obtención de FAMEs, para esta optimización se eligieron los catalizadores homogéneos, ya que son los más económicos y los de más fácil manipulación en cuanto a las condiciones de reacción (temperatura y presión moderadas). Además, permiten la obtención de elevados rendimientos de la reacción de transesterificación y son los más desarrollados y utilizados a escala industrial. Entre los catalizadores homogéneos, el tipo de catalizador escogido fue el alcalino debido a que el tiempo y la temperatura de reacción son inferiores que con respecto a los catalizadores ácidos. El hidróxido sódico es un catalizador más conveniente para el proceso de obtención de biodiesel que el hidróxido potásico, ya que al tener un menor peso molecular, se requiere una menor cantidad para lograr el mismo efecto que con KOH y, además, las sales de sodio son menos solubles en el biodiesel que las de potasio (Cvengros *et al.*, 1996). Por lo tanto, el hidróxido sódico fue el catalizador seleccionado para la realización de la reacción de transesterificación.

Los alcoholes más empleados para la producción de biodiesel son el etanol y el metanol, pero especialmente el metanol, por sus ventajas químicas y físicas (baja polaridad y cadena corta), que lo hacen reaccionar rápidamente con los triglicéridos y por su menor costo (Ma *et al.*, 1999). Además, la separación de la glicerina es más sencilla cuando se emplea metanol (Meher *et al.*, 2006b). Por otro lado, cuando se emplea etanol el rendimiento de la reacción de transesterificación suele ser mucho menor, por lo que se requiere una mayor temperatura y un mayor tiempo de reacción para obtener buenos porcentajes de FAEEs, ya que durante la etanolisis se produce la formación de emulsiones estables que complican la separación y purificación de los mismos, mientras que las emulsiones formadas entre el biodiesel y la glicerina se pueden romper con mayor facilidad al utilizar metanol (Zhang *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003).

El etanol es un candidato atractivo desde el punto de vista medioambiental porque es un producto obtenido a partir de fuentes naturales como la caña de azúcar, remolacha azucarera, etc., mientras que el metanol se obtiene principalmente de fuentes fósiles no renovables como el gas natural o gas metano. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el alcohol seleccionado debe ser esencialmente anhidro, ya que el contenido de agua en las materias primas promueve la hidrólisis de los FAMEs a FFA, favoreciéndose la formación de jabones. Asimismo, cabe destacar que el manejo del metanol es más peligroso debido a que es una sustancia tóxica y además es altamente inflamable.

Teniendo en cuenta todo lo comentado anteriormente, el metanol fue el alcohol empleado para la obtención de biodiesel, debido a su mayor reactividad, menor costo, mayor rendimiento de la reacción de transesterificación y mayor facilidad para la purificación del

biodiesel, teniendo las respectivas precauciones respecto al manejo y almacenamiento de esta sustancia.

V.2.1.2 Estudio de la influencia del tiempo de reacción

Con objeto de determinar el tiempo mínimo necesario para obtener el máximo porcentaje de FAMES, se ensayaron varios tiempos de reacción (de 0 a 120 minutos) y se determinaron los FAMES obtenidos mediante el método GC-FID optimizado en el Capítulo IV. Las condiciones iniciales para realizar la reacción de transesterificación están basadas en la experiencia previa del grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral (Brito *et al.*, 2004; Izquierdo Herrera, 2006; Martín Andara, 2008, Trujillo Hernández, 2009). En la Tabla V.2 se muestran las condiciones iniciales establecidas para cada uno de los experimentos realizados.

Tabla V.2.- Condiciones de operación para la optimización del tiempo de reacción.

Factores	Condiciones
Temperatura	60 °C
Agitación	800 rpm
NaOH	0,5 % (m/m)
Relación molar metanol-aceite	6:1 mol/mol

Una vez alcanzado el tiempo de reacción establecido en cada uno de los experimentos, el producto de la reacción se transfirió a un embudo de decantación donde permaneció, al menos, durante 24 horas, para asegurar una correcta separación de los FAMES y de la glicerina producida. El biodiesel obtenido se lavó varias veces con agua acidulada (10 % (v/v) de H₃PO₄) para eliminar los restos de metanol y catalizador que no hubieran reaccionado, y se sometió a evaporación para eliminar los restos de agua. En la Figura V.2 se muestran los porcentajes de FAMES obtenidos para los tiempos de reacción ensayados.

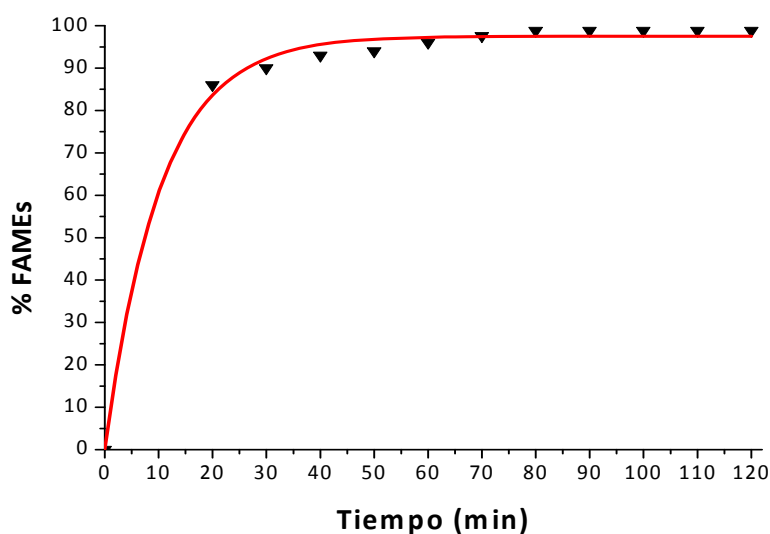


Figura V.2.- Porcentajes de FAMES obtenidos en función del tiempo de reacción.

Como se observa en esta figura, el porcentaje de FAMEs aumenta con el tiempo de reacción hasta llegar a los 80 minutos, tiempo a partir del cual el porcentaje obtenido se estabiliza, de manera que tiempos superiores no permiten obtener mejores resultados de la reacción de transesterificación de aceites vegetales. Por lo tanto, el tiempo de reacción empleado para la obtención de biodiesel fue de 80 minutos.

V.2.1.3 Estudio de la influencia de la velocidad de agitación

La agitación durante la reacción de transesterificación tiene como principal objetivo poner en contacto íntimo el aceite con el metóxido sódico, además de permitir que no se formen gradientes térmicos y volúmenes muertos en el interior del reactor. Durante el proceso suelen producirse problemas de solubilidad en los primeros minutos de la reacción debido a que el aceite es insoluble en el metanol, motivo por el cual se considera importante una agitación vigorosa desde el inicio del experimento. Debido a que la agitación aumenta el contacto entre los reactivos, se corrobora que si la agitación es pobre, la conversión de los triglicéridos en FAMEs es reducida. Una velocidad de agitación inferior a 300 rpm no es recomendable debido a que la reacción es incompleta. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo de reacción, se van formando los FAMEs, disminuyendo la viscosidad de la mezcla reaccionante y aumentando la solubilidad, con lo que se disminuyen las resistencias a la transferencia de masa (Noureddini *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1999; De Oliveira *et al.*, 2004). En la Figura V.3 se muestran los vórtices del fluido que se forman durante la agitación. A mayor velocidad de agitación, mayor es el vórtice, lo que mejora notablemente el contacto entre ambas fases.

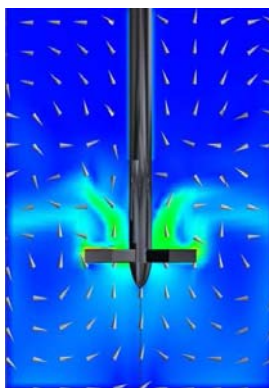


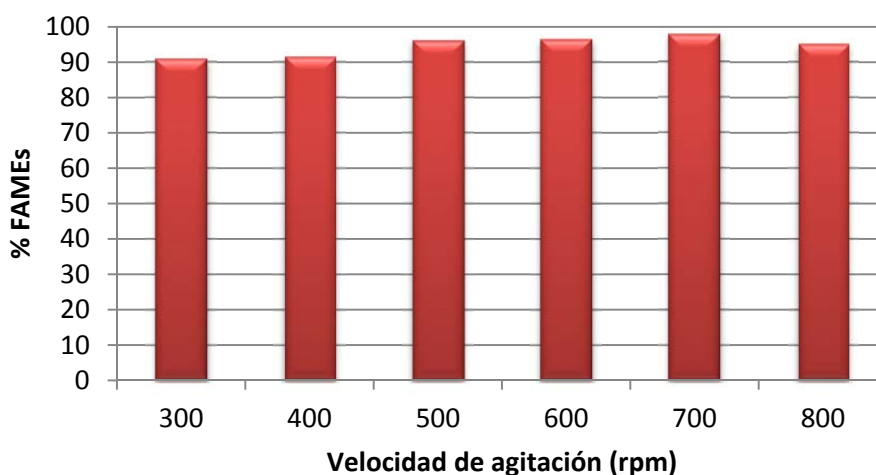
Figura V.3.- Velocidades del fluido durante la fase de agitación.

Con objeto de determinar la velocidad de agitación mínima necesaria para obtener el máximo porcentaje de FAMEs, se ensayaron varias velocidades de agitación (de 300 a 800 rpm) y se determinaron los FAMEs obtenidos mediante el método GC-FID optimizado en el Capítulo IV. En la Tabla V.3 se muestran las condiciones iniciales establecidas para cada uno de los experimentos realizados.

Tabla V.3.- Condiciones de operación para la optimización de la velocidad de agitación.

Factores	Condiciones
Tiempo	80 min
Temperatura	60 °C
NaOH	0,5 % (m/m)
Relación molar metanol-aceite	6:1 mol/mol

En la Figura V.4 se muestran los porcentajes de FAMES obtenidos para cada una de las velocidades de agitación ensayadas.

**Figura V.4.-** Porcentajes de FAMES obtenidos en función de la velocidad de agitación.

Se observa un ligero aumento del porcentaje de FAMES a medida que se incrementa la velocidad de agitación, probablemente como consecuencia de una mejor mezcla de los reactivos en el interior del reactor y a velocidades superiores a 700 rpm no se obtienen mejoras significativas en los resultados de la reacción de transesterificación, por lo que será la velocidad de agitación seleccionada para el resto del estudio.

V.2.1.4 Estudio de la influencia del lavado y del secado del biodiesel

La purificación de los FAMES obtenidos es de vital importancia ya que es necesario eliminar impurezas tales como jabones, restos de metanol, trazas de catalizador, que podrían originar problemas de corrosión en el motor, o restos de glicerina, que pueden originar problemas durante el almacenamiento del biodiesel o en el sistema de alimentación del motor, pudiendo provocar la corrosión del sistema de inyección o el aumento de las emisiones de aldehídos (Mittelbach *et al.*, 2004).

Con objeto de optimizar los diferentes parámetros que afectan al proceso de purificación del biodiesel, se han evaluado una serie de factores que afectan a la etapa de lavado, como son la concentración y volumen de la disolución de H_3PO_4 empleado en el agua de lavado, número de lavados, tiempo de decantación entre lavados y temperatura y tiempo de evaporación en el evaporador centrífugo.

En primer lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de H_3PO_4 (0; 2,5; 5 y 10 % (v/v)) presente en el agua de lavado. En la Tabla V.4 se muestran las condiciones iniciales establecidas para cada uno de los experimentos realizados.

Tabla V.4.- Condiciones de operación para la optimización de la concentración de H_3PO_4 en el agua de lavado.

Factores	Condiciones
Tiempo	80 min
Temperatura	60 °C
Agitación	700 rpm
NaOH	0,5 % (m/m)
Relación molar metanol-aceite	6:1 mol/mol

El biodiesel obtenido según las condiciones descritas en la Tabla V.4 se lavó cuatro veces con 25 mL del agua de lavado correspondiente. La mezcla se colocó en un embudo de decantación, se agitó vigorosamente y se dejó decantar durante 2 horas. En la Tabla V.5 se muestran los porcentajes de FAMES obtenidos después del lavado con la disolución acuosa acidulada.

Tabla V.5.- Porcentajes de FAMES obtenidos para las distintas concentraciones de H_3PO_4 ensayadas en el agua de lavado.

H_3PO_4 (% v/v)	% FAMES
0	95,6
2,5	96,7
5	97,7
10	97,1

Como se puede apreciar, el lavado del biodiesel con la disolución acuosa acidulada tiene influencia positiva sobre el porcentaje de FAMES obtenido. Se observa que cuando se realiza el lavado del biodiesel sólo con agua, el porcentaje de FAMES que se obtiene no alcanza el valor mínimo establecido en la normativa europea UNE-EN 14214:2009, mientras que el mejor resultado se obtuvo al emplear una disolución acuosa con un 5 % (v/v) de H_3PO_4 , que permitió conseguir un 97,7 % de FAMES.

Estos lavados con agua acidulada son indispensables para eliminar los restos de catalizador y metanol que no hayan reaccionado y que hayan quedado retenidos en la fase orgánica, así como productos secundarios de la reacción como la glicerina y posibles jabones que se hayan generado durante el proceso. Sin embargo, no permiten eliminar los ácidos grasos que no han reaccionado (mono, di y triglicéridos), cuya presencia indica que la reacción de transesterificación ha sido incompleta.

El tiempo de decantación entre lavados es un factor muy importante puesto que el biodiesel deber presentar el menor contenido posible de agua, ya que su presencia afecta al funcionamiento del motor. Además, es importante que presente poca cantidad de agua para

que durante el proceso de centrifugación y evaporación del metanol y del agua, el tiempo y la temperatura necesarios no sean excesivamente elevados y la calidad del biodiesel no se vea afectada.

Se ensayaron diferentes tiempos de decantación comprendidos entre 1 y 24 horas, comprobándose que un tiempo de 2 horas era suficiente para la adecuada separación de ambas fases, una fase de biodiesel y una fase acuosa formada por el agua de lavado que ha arrastrado los restos de catalizador, la glicerina e impurezas. El aumento del tiempo no permitió mejorar la separación, por lo que se estableció un tiempo de decantación de 2 horas entre cada lavado.

Finalmente, y con objeto de eliminar del biodiesel los posibles restos de metanol que no hubiesen reaccionado, así como los restos de agua del lavado que pudiesen haber quedado retenidos formando emulsiones en el biodiesel, se procedió a optimizar las etapas de secado del biodiesel.

El tiempo de evaporación-centrifugación se estableció en 2 horas debido a que durante este tiempo se permitió clarificar el biodiesel, al mismo tiempo que se podía evaporar todo el metanol y los restos de agua. Tiempos inferiores a 2 horas no permitieron separar y evaporar estas sustancias, ya que se obtenían muestras de biodiesel turbias y con sustancias en suspensión.

Las temperaturas de evaporación-centrifugación ensayadas estaban comprendidas entre 60 y 90 °C. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la muestra de biodiesel se evaporó-centrifugó a una temperatura de 80 °C, ya que al ser una temperatura superior a la temperatura de ebullición del metanol (65 °C), permite la evaporación de los restos de metanol que hayan podido quedar retenidos y que no fueron eliminados durante el proceso de lavado. Además, esta temperatura permitió la evaporación de los posibles restos de agua, ya que la evaporación se realizó a vacío. Se observó que temperaturas inferiores a 80 °C no permitían eliminar los restos de agua, puesto que se necesitaría un mayor tiempo de evaporación (superior a 2 horas). Por lo tanto, se estableció una temperatura de evaporación-centrifugación óptima de 80 °C durante un tiempo de 2 horas.

V.2.2 Optimización del proceso de obtención de biodiesel mediante diseño factorial de experimentos

El diseño factorial de experimentos permite optimizar la reacción de transesterificación, ya que al tratar conjuntamente las variables que intervienen en el proceso, permite la determinación del campo de validez de las mismas, el error experimental cometido y las posibles interacciones que puedan existir entre ellas, proporcionando además un modelo matemático polinómico que describe el comportamiento del sistema objeto de estudio dentro de los límites de trabajo establecidos. El diseño factorial de experimentos ha sido ampliamente utilizado para optimizar el proceso de producción de FAMES a partir de diferentes tipos de

aceites como girasol, colza, aceites de fritura, aceites no comestibles, etc. (Vicente *et al.*, 1998, 2005, 2007a, 2007b; Tashtoush *et al.*, 2004; Ghadge *et al.*, 2006; Bouaid *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Bautista *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2009; Ferella *et al.*, 2010; Kafuku *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011).

El principal objetivo de este capítulo es la optimización de la obtención de FAMEs a partir de aceite de girasol sin usar, mediante catálisis homogénea, utilizando un reactor discontinuo. La optimización se dirige a la obtención del máximo porcentaje de FAMEs de la reacción de transesterificación y, en términos generales, exige que las etapas a seguir sean las siguientes:

- Elección de la variable respuesta a medir
- Elección de las variables objeto de estudio
- Elección del intervalo de estudio para dichas variables
- Planificación, realización de experimentos y recogida de datos
- Estudio y ajuste de los datos experimentales a modelos estadísticos (de primer y/o segundo orden)
- Análisis de los resultados y construcción de las superficies de respuesta

El diseño de experimentos se realizó utilizando el software *StatGraphics Centurion*, siendo la variable respuesta el porcentaje de FAMEs obtenido en la reacción de transesterificación catalítica homogénea. La elección de dicha respuesta presupone que los métodos de toma de muestras y analíticos están debidamente resueltos y que el valor de dicha variable sea capaz de cuantificar la validez, al menos técnica, del proceso.

V.2.2.1 Diseño factorial de experimentos de primer orden

El diseño de experimentos planteado consiste en un sistema con 2^3 experimentos, es decir, con tres factores a dos niveles. La selección de los principales factores y sus intervalos de operación se llevó a cabo teniendo en cuenta la experimentación previa realizada, los datos recopilados de la bibliografía y la experiencia previa del grupo de investigación en el estudio de procesos similares. Las variables (factores) estimadas en el diseño de experimentos fueron:

- Temperatura de reacción
- Relación molar metanol-aceite
- Concentración de catalizador

En base a los estudios previos realizados, la velocidad de agitación durante la reacción de transesterificación se ha mantenido constante en todos los experimentos realizados en el valor óptimo encontrado de 700 rpm. Además, los experimentos se han realizado a presión atmosférica durante 80 minutos, con un tiempo mínimo de separación de las fases obtenidas después de la reacción de 24 horas.

Las especificaciones de los reactivos empleados imponen las condiciones límite de operación para la temperatura de reacción. El límite superior se ha fijado en 65°C, ya que se trata de la temperatura de ebullición del metanol. Hay que tener en cuenta que la temperatura de reacción no debe superar los 65 °C, pues a partir de ésta se destila el metanol, lo que origina una menor cantidad de este reactivo y se disminuya la conversión de la reacción. El límite inferior se ha fijado en 35 °C, ligeramente superior a la temperatura ambiente, para poder obtener porcentajes de FAMEs en el tiempo de reacción óptimo (80 min).

La concentración de catalizador (NaOH) se refiere al tanto por ciento en peso respecto a la cantidad de aceite empleada en los experimentos. Según la bibliografía consultada, el límite inferior se encuentra en un 0,5 % (m/m), mientras que para el límite superior se considera un 1,5 % (m/m).

Con respecto a la relación molar metanol-aceite, este parámetro se estudió entre 3:1, es decir, la correspondiente a la estequiometría de la reacción, y 9:1, equivalente al triple de la relación estequiométrica, para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos. Estos valores están en concordancia con los datos encontrados en la bibliografía consultada (Felizardo *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006a; Vicente *et al.*, 2007a; 2007b; Çaylı *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Eevera *et al.*, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2009; Balat *et al.*, 2010; Ferella *et al.*, 2010; Kafuku *et al.*, 2010; Keera *et al.*, 2011). En la Tabla V.6 se muestran los factores elegidos para el diseño de experimentos y sus respectivos niveles.

Tabla V.6.- Factores principales y niveles inferior y superior para el diseño de experimentos.

Factor	Designación	Nivel inferior	Nivel superior
Temperatura (T, °C)	X_T	35	65
Relación molar (RM, mol/mol)	X_{RM}	3:1	9:1
Concentración de catalizador (C, % m/m)	X_C	0,5	1,5

En una primera etapa del proceso de optimización, se realizó un análisis de *screening* con objeto de evaluar la influencia de las variables entre sí. El diseño factorial con 2^k experimentos se desarrolla considerando las variables indicadas anteriormente: temperatura, relación molar metanol-aceite y concentración de catalizador. Por lo tanto, la realización del diseño factorial ($k=3$) implica la necesidad de realizar 8 experimentos, al mismo tiempo que se realizan 4 repeticiones de los experimentos en el punto central.

Este tipo de diseño permitió abarcar información de todos los factores con menos experimentos sin perder eficiencia. Además, por ser ortogonal y rotatable, permite medir los efectos de los factores de forma libre y se puede estimar la respuesta, con igual varianza, independientemente de la dirección del centro del diseño. Las réplicas en el punto central permiten determinar el error experimental. Los experimentos se realizaron en orden aleatorio, a fin de obtener una distribución estadística lo más homogénea posible y disminuir los posibles errores matemáticos. La aleatorización es fundamental en el diseño ya que indica el orden en

el que se ejecutan las pruebas y, además, es esencial para eliminar el error causado por variables que no se pueden medir ni controlar experimentalmente.

En la Tabla V.7 se muestra la programación de las pruebas experimentales, así como la matriz representativa del diseño factorial realizado con los valores codificados, en la que los signos positivos representan el límite superior de cada variable y los signos negativos el límite inferior de las mismas, mientras que los puntos centrales se designan como cero. Además, se muestran los porcentajes de FAMEs obtenidos para cada uno de los experimentos mencionados.

Tabla V.7.- Matriz experimental del diseño factorial de experimentos de primer orden y porcentajes de FAMEs obtenidos para cada experimento.

Experimento	T (°C)	RM (mol/mol)	C (% m/m)	X _T	X _{RM}	X _C	% FAMEs
1	65	9	1,5	+	+	+	96,24
2	50	6	1	0	0	0	91,79
3	35	3	0,5	-	-	-	84,22
4	65	3	0,5	+	-	-	96,58
5	35	3	1,5	-	-	+	94,23
6	35	9	0,5	-	+	-	88,47
7	35	9	1,5	-	+	+	81,22
8	50	6	1	0	0	0	91,33
9	65	3	1,5	+	-	+	96,11
10	50	6	1	0	0	0	92,06
11	50	6	1	0	0	0	91,58
12	65	9	0,5	+	-	-	97,10

A continuación, se realizaron las pruebas de significación estableciendo un nivel de confianza del 95 %. Además, se calcularon los parámetros indicativos del ajuste, como el valor medio de la variable dependiente, la desviación estándar y la t de *Student*. En la Tabla V.8 se muestran los resultados de las pruebas de significación realizadas para el modelo lineal de primer orden estudiado.

Tabla V.8.- Resultados de las pruebas de significación, empleando el método de replicación en los puntos centrales.

Respuesta	Acrónimo	% FAMEs
Media puntos factoriales	X _f	90,45
Media puntos centrales	X _c	91,69
Desviación estándar	s	0,127
t de Student	t	2,776
Curvatura	C= X _c -X _f	1,24
Intervalo de Confianza	I.C.	0,740

Como se observa, el modelo obtenido para la respuesta presenta un valor del efecto de la curvatura significativo, ya que su valor medio para los experimentos realizados en los puntos centrales y el valor medio de las respuestas de los experimentos factoriales es superior al intervalo de confianza obtenido para el porcentaje de FAMEs, por lo que la curvatura es significativa en el modelo de orden lineal. En la Figura V.5 se muestra el gráfico de Pareto, en el que se observa y clasifica de manera más detallada la magnitud de cada uno de los efectos.

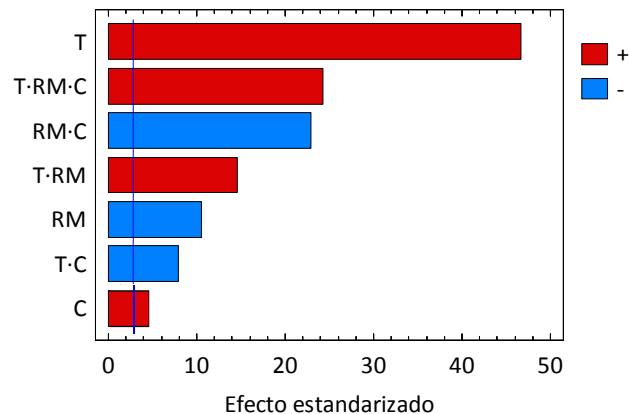


Figura V.5.- Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados en el modelo lineal.

En la figura anterior, la línea vertical se utiliza para conocer qué efectos son estadísticamente significativos. Cualquier barra que se extienda más allá de esta línea se corresponde con efectos que son estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95,0 %. Se puede observar que las tres variables de estudio afectan a la producción de FAMEs, la temperatura es la variable que más incide en dicha producción, seguido por la relación molar metanol-aceite y, finalmente, la concentración de catalizador. Esto indicó la necesidad de emplear un modelo de orden superior, es decir, de segundo orden, para explicar el campo experimental ensayado respecto al porcentaje de FAMEs obtenido para cada uno de los experimentos estudiados.

En la Figura V.6 se muestra la gráfica de residuos para el porcentaje de FAMEs. Si el modelo lineal que se ha empleado fuera correcto, los residuos deberían carecer de estructura y aparecer como ruido, pues toda la señal contenida en los datos ha sido explicada por el mencionado modelo.

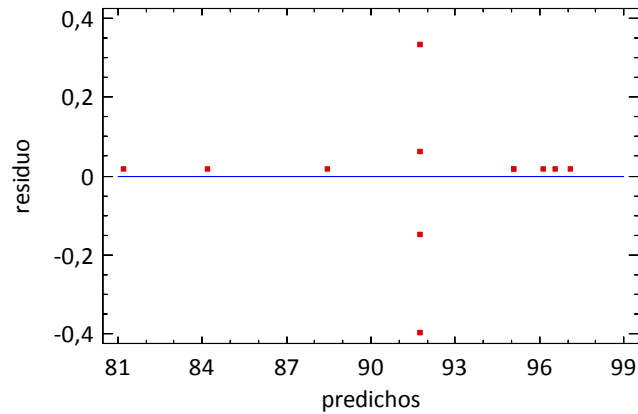


Figura V.6.- Gráfico de residuos para el diseño de experimentos de orden lineal.

En la figura anterior se observa que aparece curvatura en el gráfico de residuos al realizar la diagnosis del modelo estadístico, apareciendo los datos en forma de cruz, siendo necesario plantear un modelo no lineal, de segundo orden, que tenga en cuenta los términos cuadráticos. Se observa que es inevitable aumentar el número de puntos experimentales, con los denominados puntos estrellas, para poder evaluar el diseño experimental de orden cuadrático.

V.2.2.2 Diseño factorial de experimentos de segundo orden

En este modelo, la experimentación se ha planificado de acuerdo con las características de un diseño factorial central de experimentos, donde se ha ampliado el número de experimentos para obtener un modelo matemático de segundo orden. Según esto, el modelo cuadrático empleó los experimentos del diseño factorial en los niveles superior (+1) e inferior (-1), utilizados en el modelo de orden lineal, los experimentos en los puntos centrales correspondientes al nivel 0, empleados en la estimación del error del modelo lineal, así como un tercer nivel de experimentación denominado puntos estrellas, fijado según los parámetros $+\alpha$ y $-\alpha$. El modelo cuadrático implicó la necesidad de realizar seis experimentos adicionales con los puntos estrellas, por lo que la matriz experimental del modelo se tuvo que aumentar.

En la Tabla V.9 se muestran los valores obtenidos para todos los niveles, incluidos los experimentos adicionales, de los factores estudiados así como el porcentaje de FAMES obtenido en cada experimento junto con la matriz experimental representativa del diseño factorial completo.

Tabla V.9.- Matriz experimental del diseño factorial de experimentos de segundo orden y porcentajes de FAMEs obtenidos para cada experimento.

Experimento	T (°C)	RM (mol/mol)	C (% m/m)	X _T	X _{RM}	X _C	% FAMEs
1	65	9	1,5	+	+	+	96,24
2	50	6	1	0	0	0	91,79
3	35	3	0,5	-	-	-	84,22
4	65	3	0,5	+	-	-	96,58
5	35	3	1,5	-	-	+	94,23
6	35	9	0,5	-	+	-	88,47
7	35	9	1,5	-	+	+	81,22
8	50	6	1	0	0	0	91,33
9	65	3	1,5	+	-	+	96,11
10	50	6	1	0	0	0	92,06
11	50	6	1	0	0	0	91,58
12	65	9	0,5	+	-	-	97,10
13	50	11,48	1	0	+α	0	93,45
14	50	0,52	1	0	-α	0	55,78
15	77,39	6	1	+α	0	0	57,86
16	50	6	1,91	0	0	+α	94,48
17	50	6	0,09	0	0	-α	49,78
18	22,61	6	1	-α	0	0	93,34

A continuación, se realizó el ajuste correspondiente mediante regresión no lineal para obtener una expresión cuadrática de la respuesta optimizada. Dicho modelo se obtuvo ajustando la respuesta (porcentaje de FAMEs) frente a los valores estadísticos de los efectos consignados como +1 para el límite superior del intervalo, -1 para el límite inferior del intervalo y 0 para el punto central del intervalo. Los valores de los puntos estrella vienen definidos por +α y -α, para este caso concreto 1,682 y -1,682, respectivamente, según el número de niveles y de factores considerados en el diseño de experimentos. El modelo matemático obtenido para los tres factores estudiados al que se pretende ajustar los resultados experimentales fue el siguiente:

$$\begin{aligned} \% \text{ FAMEs} = & 98,0123 + 21,005 \cdot X_T + 9,684 \cdot X_{RM} - 10,883 \cdot X_C + 1,196 \cdot X_T^2 - 0,543 \cdot X_T \\ & \cdot X_{RM} + 4,896 \cdot X_T \cdot X_C - 4,125 \cdot X_{RM}^2 + 2,458 \cdot X_{RM} \cdot X_C - 19,569 \cdot X_C^2 \\ & - 0,021 \cdot X_T \cdot X_{RM} \cdot X_C \end{aligned}$$

El coeficiente de regresión para este modelo estadístico es 0,9967, lo que indica que el modelo propuesto se ajusta adecuadamente a los resultados experimentales. Como puede observarse en la ecuación del modelo estadístico, los efectos representativos del diseño experimental son los efectos principales, con una mayor dependencia positiva de la temperatura de reacción (T) y de la relación molar (RM), seguida de un efecto negativo para la concentración de catalizador (C). En cuanto a los efectos cuadráticos, el que mayor

dependencia origina en el diseño, de forma negativa, es el de la concentración del catalizador (C-C), seguido del de la relación molar (RM·RM), también en sentido negativo y, finalizando, en modo positivo, con el de la temperatura (T·T). Con relación a los efectos cruzados entre los efectos principales, los que mayor dependencia presentan son los efectos entre la temperatura y la concentración de catalizador (T·C) y entre la relación molar y la concentración de catalizador (RM·C), en sentido positivo, y entre la temperatura y la relación molar (T·RM), en sentido negativo. Se observa que el efecto triple entre los tres factores estudiados (T·RM·C) es el que menor efecto presenta, ya que el valor encontrado es prácticamente despreciable. En la Figura V.7 se muestra el gráfico de Pareto, en el que observa y clasifica la magnitud de cada uno de los efectos mencionados.

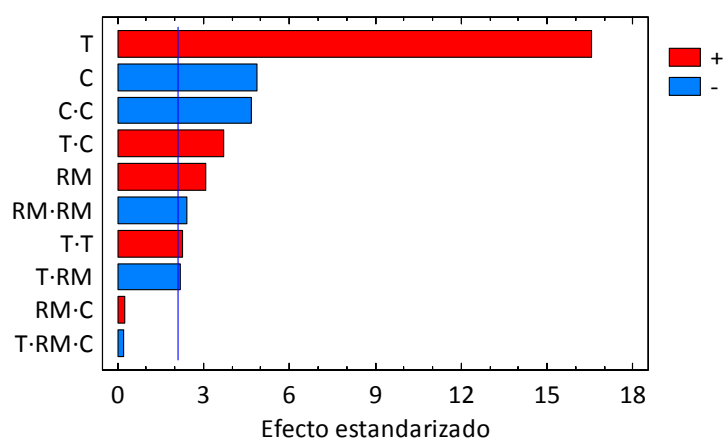


Figura V.7.- Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados en el modelo cuadrático.

En esta figura, las barras señaladas en azul representan factores que poseen un efecto negativo sobre la producción de biodiesel, mientras que las barras de color rojo poseen un efecto positivo. El diagrama de Pareto es una herramienta que permite visualizar la magnitud de los efectos principales sobre la producción de FAMEs, ya que se representan las magnitudes globales de cada efecto sin describir la magnitud de cada uno de ellos al pasar de un nivel bajo a un nivel alto, lo que quiere decir que es posible que un factor en un nivel bajo tenga efecto negativo sobre la variable de respuesta y a un nivel alto tenga efecto positivo. Se observa que las tres variables estudiadas afectan a la producción de FAMEs, ya que presentan efectos que son estadísticamente significativos al 95 % de nivel de confianza. La temperatura (T) es la variable que más influye en dicha producción, seguido por la concentración de catalizador (C) y, finalmente, por la relación molar (RM) metanol-aceite. Se observa que la temperatura y la relación molar presentan efectos positivos en la reacción de transesterificación, mientras que la concentración de catalizador presenta efectos negativos, debido a que su presencia, en exceso, origina la formación de reacciones secundarias de saponificación. Los factores cruzados RM·C y T·RM·C no son estadísticamente significativos al nivel de confianza estudiado.

En la Figura V.8 se muestra el gráfico de los efectos principales, indicando el resultado de la variación de los factores principales al pasar de un nivel bajo a un nivel alto.

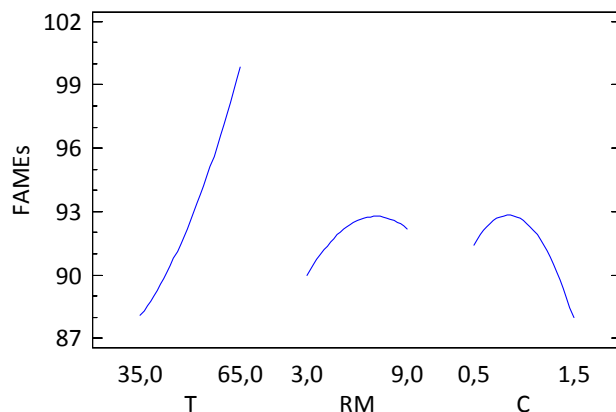


Figura V.8.- Gráfico de efectos principales sobre el porcentaje de FAMEs.

La Figura V.8 muestra la concentración de FAMEs estimada, en porcentaje, como una función de cada factor experimental estudiado. En cada gráfico, el factor de interés varía desde su nivel más bajo a su nivel más alto, mientras que el resto de factores se mantienen constantes en sus valores bajos. La temperatura de reacción (T) muestra un efecto positivo, con una clara tendencia a aumentar la concentración de FAMEs al ir aumentando la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de transesterificación, obteniendo valores próximos al 100 % al realizar la reacción a 65 °C. La relación molar (RM) metanol-aceite muestra una tendencia parabólica, observándose que, aproximadamente para un valor intermedio de 6:1, el porcentaje de FAMEs obtenido es máximo. A partir de este valor la variable respuesta del sistema empieza a disminuir, con lo que el porcentaje de FAMEs disminuye. De igual forma, la concentración de catalizador (C) sigue un comportamiento parabólico, su punto máximo (1,0 %) corresponde al valor idóneo para obtener mayor conversión de la reacción, resultado coherente con los datos experimentales y con la bibliografía. Mediante este diseño factorial de experimentos se ha demostrado que existe una concentración de catalizador por encima de la cual el porcentaje de FAMEs disminuye debido al aumento de las reacciones secundarias de saponificación.

En la Figura V.9 se muestra el comportamiento de los efectos cruzados sobre la producción de FAMEs en el modelo cuadrático.

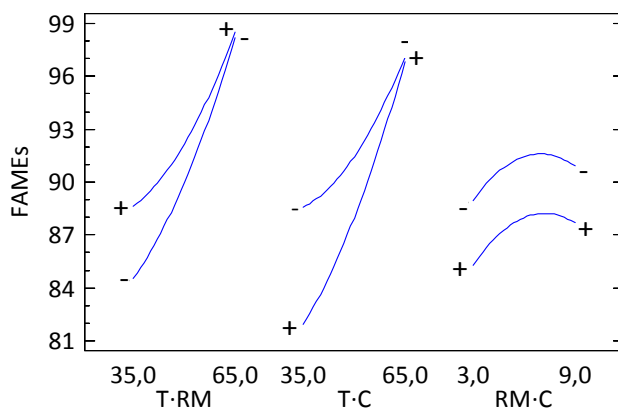


Figura V.9.- Gráfico de efectos cruzados sobre el porcentaje de FAMEs.

En la figura anterior cada factor varía desde su nivel más bajo a su nivel más alto. El signo de las líneas indican si el segundo factor de la interacción se encuentra en un nivel alto (+) o bajo (-), mientras muestra la tendencia del primer factor en dichos niveles. El tercer factor siempre se mantiene en el nivel más bajo. Para el primer factor cruzado T·RM, se observa que tanto para relaciones molares bajas (-) como altas (+), a medida que aumenta la temperatura de su nivel bajo al nivel alto (de 35 a 65 °C), la concentración de FAMEs obtenida se modifica sustancialmente. Para la temperatura de 35 °C, el porcentaje de FAMEs obtenido se modifica desde, aproximadamente, un 85 % para el nivel bajo hasta un 88 % de FAMEs para una relación molar alta. En cambio, para una temperatura de 65 °C, tanto a relaciones molares altas como bajas, el porcentaje de FAMEs alcanza un valor aproximado del 98 %, lo que sugiere que la temperatura de la reacción a fijar sea la más elevada.

De igual forma, se observa que para el factor cruzado T·C, se obtienen mayores porcentajes de FAMEs cuando se emplea una concentración baja de catalizador, debido a la formación de jabones, que origina una disminución en la conversión de la reacción de transesterificación cuando se emplean concentraciones altas de catalizador. Se observa que, para este factor, a temperatura baja (35 °C), la concentración de catalizador alta (+) permite obtener un porcentaje de FAMEs de, aproximadamente, un 82 %, mientras que para una concentración baja de catalizador (-), el producto de la reacción aumenta hasta un 88 %. En cambio, para temperatura alta (65 °C), la concentración de FAMEs obtenida es muy similar, en torno a un 96 %, tanto para concentraciones de catalizador baja (-) como alta (+), siendo ligeramente superior para concentraciones bajas. Por tanto, el efecto cruzado T·C afecta de forma positiva al porcentaje de FAMEs obtenido en la reacción a una temperatura de 65 °C. Este resultado es coherente con la información mostrada en el diagrama de Pareto.

Haciendo un análisis similar del factor cruzado C·RM, se observa que para relaciones molares bajas y concentraciones de catalizador altas (+) o bajas (-), el porcentaje de FAMEs aumenta hasta un valor máximo y luego decrece según aumenta la relación molar. Sin embargo, cabe destacar que según va aumentando la relación molar metanol-aceite cuando la concentración de catalizador es baja (-), se obtienen los máximos porcentajes de FAMEs. De esta forma, se observa que una relación molar de, aproximadamente, 6:1 permite obtener los mejores resultados del diseño.

Posteriormente, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos experimentalmente, lo que permitió determinar el efecto de los factores y de sus interacciones sobre la variable respuesta del diseño factorial de experimentos. En la Tabla V.10 se recogen los resultados obtenidos para dicho análisis.

Tabla V.10.- Resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de FAMEs.

Variable	Suma cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	Relación F	p-valor
T	620,459	1	620,459	273,59	0,0000
RM	21,714	1	21,714	9,57	0,0070
C	53,7685	1	53,7685	23,71	0,0002
T·T	11,7227	1	11,7227	5,17	0,0371
T·RM	10,83	1	10,83	4,78	0,0441
T·C	30,784	1	30,784	13,57	0,0020
RM·RM	13,271	1	13,271	5,85	0,0278
RM·C	0,163333	1	0,163333	0,07	0,7918
C·C	49,4405	1	49,4405	21,80	0,0003
T·RM·C	0,08405	1	0,08405	0,04	0,8498
Error total	36,2859	16	2,26787		
Total (corr.)	848,523	26			

La Tabla V.10 divide la variabilidad de la respuesta (porcentaje de FAMEs) en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. El p-valor o la relación F son los estadísticos que permiten determinar la magnitud y existencia de efectos cruzados sobre la variable respuesta. En este caso, ocho de los efectos presentan p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativos para un intervalo de confianza del 95 %. La relación F proporciona la misma información que el p-valor. Según las tablas de la distribución F de *Fischer* (Miller *et al.*, 2002; Montgomery *et al.*, 2002) para una distribución F, el valor de un F crítico es igual a 4,99, con un 95 % del intervalo de confianza y 16 grados de libertad. Por lo tanto, todos los valores F que sean mayores que el F crítico tienen efecto significativo sobre la variable de respuesta. En la Tabla V.10 se observa, a partir de la relación F y del p-valor, que los factores que poseen efecto sobre la variable respuesta son los mismos que los indicados según el gráfico de Pareto (T, C, RM, T·T, T·RM, T·C, RM·RM y C·C). Además, en la citada tabla los términos correspondientes a la suma de cuadrados y cuadrados medios de los factores están directamente relacionados con la magnitud de cada efecto, como ya se ha comentado.

Con los resultados obtenidos a partir de los experimentos correspondientes al diseño factorial, se ha realizado el ajuste por regresión no lineal múltiple. El ajuste emplea los valores reales de las variables, con sus unidades, y las respuestas obtenidas experimentalmente. Mediante este ajuste se obtiene el modelo experimental para la reacción de transesterificación de aceite de girasol sin usar con metanol utilizando NaOH como catalizador. Este modelo es indispensable para pronosticar los porcentajes de FAMEs en otras condiciones que estén dentro del intervalo experimental. La ecuación del modelo experimental ajustado es la siguiente:

$$\begin{aligned} \% \text{ FAMEs} = & 78,545 + 34,405 \cdot T + 3,099 \cdot \text{RM} - 6,997 \cdot C + 0,165 \cdot T^2 - 0,016 \cdot T \cdot \text{RM} \\ & + 0,249 \cdot T \cdot C - 0,189 \cdot \text{RM}^2 + 0,306 \cdot \text{RM} \cdot C - 11,482 \cdot C^2 - 0,005 \cdot T \\ & \cdot \text{RM} \cdot C \end{aligned}$$

donde T es la temperatura de reacción en grados centígrados, C es la concentración de catalizador en tanto por ciento en peso con respecto al aceite, y RM es la relación molar metanol-aceite. El coeficiente de regresión para este modelo experimental es 0,9872, lo que indica que el modelo propuesto se ajusta a los resultados experimentales. Para cuantificar la validez del modelo se realizaron los correspondientes análisis de residuos. En la Figura V.10 se muestra la representación gráfica de los residuos frente a los valores predichos por este modelo para el porcentaje de FAMEs.

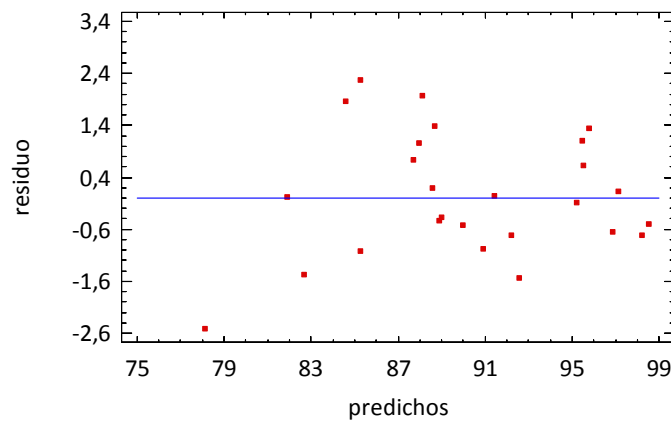


Figura V.10.- Gráfico de residuos para el diseño de experimentos de segundo orden.

A partir de las pruebas de residuos realizadas, no se observa ninguna tendencia en la desviación de los puntos centrales al resto de los puntos experimentales, siguiendo una distribución aleatoria, lo que garantiza que no existe correlación entre los errores. Por lo tanto, se puede concluir que el modelo no lineal reproduce los datos experimentales, por lo que se podría utilizar como modelo para la optimización del proceso estudiado. Asimismo, la bondad del ajuste se puede visualizar representando los puntos experimentales observados frente al modelo teórico propuesto, con lo que se determina el error cometido al emplear dicho modelo. En la Figura V.11 se muestra el ajuste de los datos experimentales y los valores predichos por este modelo para el porcentaje de FAMEs.

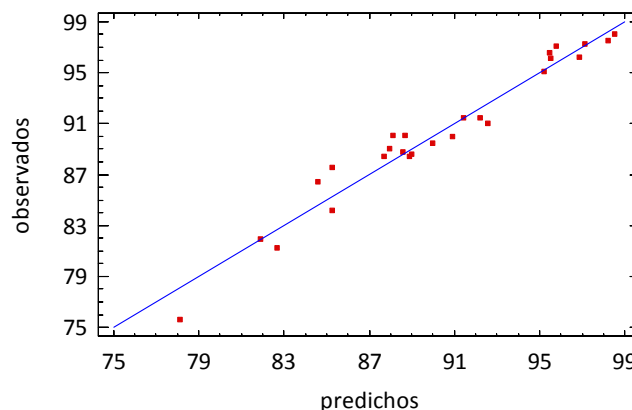


Figura V.11.- Ajuste de los datos experimentales y los predichos por el modelo.

En la Figura V.11 se observa que la representación de los valores predichos por el modelo frente a los observados experimentalmente se ajustan a una línea recta de ecuación $Y = 0,9993 \cdot X + 0,1085$, con un coeficiente de correlación (r) de 0,9972, lo que confirma que los resultados experimentales son estadísticamente similares a los estimados, corroborándose la bondad del ajuste.

El diseño de experimentos está basado en una distribución normal de los residuos. Con objeto de comprobar la suposición de normalidad, se emplea la gráfica de probabilidad normal de los residuos. La Figura V.12 muestra la representación de los porcentajes de FAMEs obtenidos frente a los residuos.

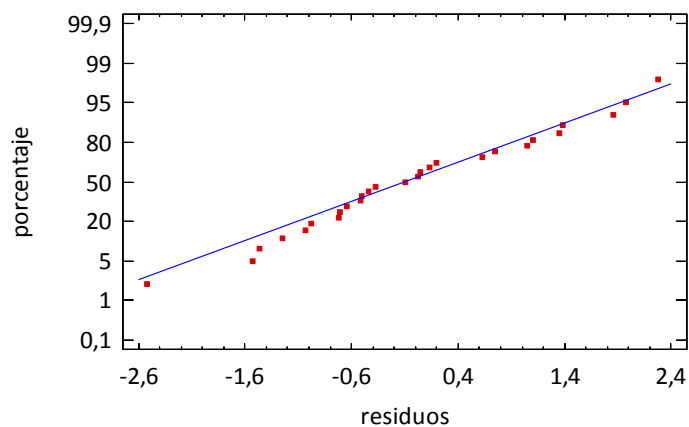
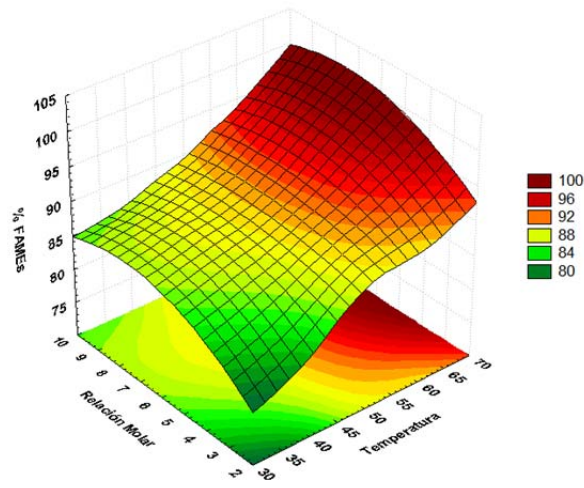


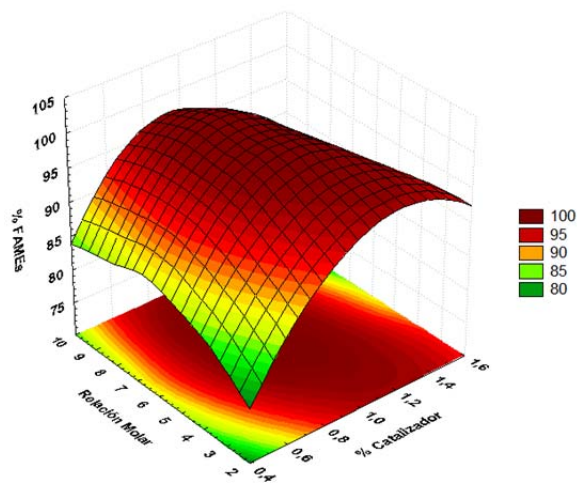
Figura V.12.- Grafico de probabilidad normal del porcentaje de FAMEs.

El gráfico de probabilidad normal permite corroborar la hipótesis de normalidad del modelo propuesto y que la distribución de los residuos es normal. Si los residuos siguen una distribución normal, los puntos se encontrarán, aproximadamente, a lo largo de una línea recta. Cualquier desviación uniforme de una línea recta sería una señal de comportamiento no normal. Como se observa en la Figura V.12 los residuos se ajustan adecuadamente a la recta normal, por lo que se deduce que los residuos presentan una distribución normal.

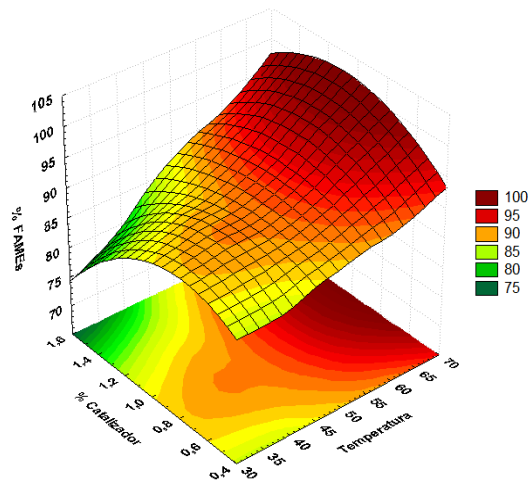
La ecuación del modelo experimental obtenido permite analizar el sistema mediante el empleo de las superficies de respuesta, que permiten visualizar, el efecto global de todos los factores sobre el porcentaje de FAMEs. Además, son útiles para encontrar la región en la que se encuentra el punto óptimo dentro del intervalo experimental analizado. En la Figura V.13 se muestran las superficies de respuesta obtenidas para los distintos factores estudiados en el diseño factorial de experimentos de segundo orden.



A



B



C

Figura V.13.- Superficies de respuesta del diseño factorial de experimentos compuesto por un punto central para el biodiesel de aceite de girasol sin usar. Superficie de respuesta: relación molar-temperatura (A). Superficie de respuesta: relación molar-% de catalizador (B). Superficie de respuesta: % catalizador-temperatura (C).

Con ayuda de los gráficos de contorno de las superficies de respuesta, se localiza de una manera más aproximada el valor del punto óptimo de la reacción. Cada curva coloreada representa una isostera (curva de porcentaje de FAMES constante). Los valores óptimos se recogen en la Tabla V.11, donde se observa que los valores encontrados por el programa están

de acuerdo con los valores que se pueden observar en las superficies de respuesta. El valor óptimo obtenido para el porcentaje de FAMEs, mediante la aplicación del diseño factorial de experimentos, fue 99,85 %.

Tabla V.11.- Condiciones óptimas obtenidas mediante el diseño de experimentos.

Factor	Unidad	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	°C	35,0	65,0	65,0
Relación molar metanol-aceite	mol/mol	3,0	9,0	6,15
Concentración de catalizador	% (m/m)	0,5	1,5	0,99

En la Tabla V.12 se resumen las condiciones de operación óptimas necesarias para llevar a cabo la reacción de transesterificación, obtenidas a partir de los experimentos previos y mediante el diseño factorial de experimentos.

Tabla V.12.- Condiciones de operación óptimas para la realización de la reacción de transesterificación de aceites vegetales obtenidas a partir de la optimización.

Factores	Condiciones
Tiempo	80 min
Temperatura	65 °C
Agitación	700 rpm
NaOH	1,0 % (m/m)
Relación molar metanol-aceite	6,15:1 mol/mol
Lavado H₃PO₄	5 % (m/m)

A pesar de que la temperatura de la reacción era próxima al punto de ebullición del metanol, al realizar los experimentos a esta temperatura no se produjeron pérdidas de metanol durante la reacción, ya que el reactor disponía de un condensador de vidrio por el que circulaba agua fría, y por lo tanto, el metanol que se evaporaba durante el proceso regresaba al medio de reacción al condensarse. Se consideró que, a efectos prácticos, la relación molar metanol-aceite óptima debía ser 6,15:1 y que la concentración de catalizador óptima era, prácticamente, de 1,0 % (m/m).

V.3 Determinación del contenido de FAMES en muestras de biodiesel

Una vez determinadas las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción de transesterificación, éstas fueron aplicadas para la obtención de biodiesel a partir de diferentes tipos de aceites, tanto sin usar como procedentes de procesos de fritura. En la Tabla V.13 se recogen los diferentes tipos de aceite utilizados y los acrónimos de las muestras de biodiesel obtenidas, mediante catálisis homogénea alcalina.

Tabla V.13.- Muestras de aceite y biodiesel estudiadas.

Muestra de aceite		Acrónimo	Muestra de biodiesel (Acrónimo)
Oliva	Sin usar	AOL	BAOL
	Fritura	AOF	BAOF
Girasol	Sin usar	AGL	BAGL
	Fritura	AGF	BAGF
Semillas	Sin usar	ASL	BASL
	Fritura	ASF	BASF
Colza	Sin usar	ACL	BACL
	Fritura	ACF	BACF
Maíz	Sin usar	AML	BAML
	Fritura	AMF	BAMF
Soja-Girasol	Sin usar	ASGL	BASGL
	Fritura	ASGF	BASGF
Oliva-Girasol	Fritura	AOGF	BAOGF
Oliva-Girasol-Maíz	Fritura	AOGMF	BAOGMF

El procedimiento experimental utilizado para llevar a cabo la reacción de transesterificación se encuentra descrito en el Capítulo III. Las muestras de aceite procedentes de procesos de fritura fueron previamente filtradas a vacío, con objeto de eliminar los sólidos en suspensión procedentes de los restos de alimentos. Además, se sometieron a una etapa previa de deshidratación con $MgSO_4$ anhidro y, posteriormente, a filtración a vacío con objeto de eliminar cualquier materia en suspensión y los restos de $MgSO_4$ (Felizardo *et al.*, 2006; Reefat, 2010). De esta forma, se consigue eliminar los restos de agua que hayan quedado retenidos en estos tipos de aceite durante el proceso de fritura, al mismo tiempo que se disminuye el contenido en FFA presentes en estos aceites.

Como se ha comentado, la presencia de agua en el aceite de partida produce reacciones secundarias de saponificación o neutralización y, por consiguiente, la formación de jabones que dificulta el proceso de separación del biodiesel y la glicerina, disminuyendo el rendimiento del proceso. La fase inferior que queda después de la separación del biodiesel está compuesta por glicerina y restos de catalizador, metanol, mono, di y triglicéridos que no hayan reaccionado durante la reacción de transesterificación. En la Figura V.14 se muestra un ejemplo de los productos de la reacción de transesterificación antes de realizar las etapas de

lavado con H_3PO_4 y el posterior secado para una muestra de biodiesel procedente de aceite de fritura (izquierda) y de aceite sin usar (derecha), observándose la formación de las dos fases, biodiesel en la fase superior y la glicerina en la inferior.



Figura V.14.- Productos de la reacción de transesterificación a partir de aceites de fritura (izquierda) y sin usar (derecha).

Se observa que, cuando se emplean aceites de fritura, el biodiesel obtenido presenta un color marrón-amarillento (izquierda), mientras que si se emplea como materia prima el aceite sin usar, el biodiesel obtenido es mucho más claro y de un tono blanquecino (derecha). En ambos tipos de biodiesel se observa un cierto grado de turbidez o color opaco, que desaparece al realizar las etapas de lavado y la posterior evaporación de los restos de agua y/o metanol que hayan quedado retenidos. El lavado del biodiesel disminuye el contenido de glicerina libre y total que hubiese quedado suspendida en la fase biodiesel, aumentando el porcentaje de FAMES. En la Figura V.15 se observa el producto de la reacción de transesterificación antes (izquierda) y después (derecha) de las etapas de lavado y secado del biodiesel obtenido a partir de aceite de fritura (arriba) y de aceite sin usar (abajo).



Figura V.15.- Biodiesel obtenido a partir de aceite de fritura (arriba) y sin usar (abajo), antes (izquierda) y después (derecha) de las etapas de lavado y secado.

Como se observa en la figura anterior, el producto final después de las etapas de lavado y secado es un líquido semitransparente ámbar-amarillento claro, cuya tonalidad es función del tipo de materia prima empleada, siendo más oscuro para el biodiesel obtenido a partir de aceite de fritura.

La determinación de FAMES en las muestras de biodiesel obtenidas se realizó según el procedimiento optimizado de GC-FID descrito en el Capítulo IV. En la Figura V.16 se muestra el cromatograma obtenido mediante GC-FID para una muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva sin usar, mientras que en la Figura V.17 se muestra un cromatograma obtenido mediante GC-FID para una muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de girasol de fritura donde las diferentes señales se corresponden con los FAMES presentes en ambos tipos de biodiesel. Los distintos picos obtenidos se corresponden con las señales determinadas en el Capítulo IV.

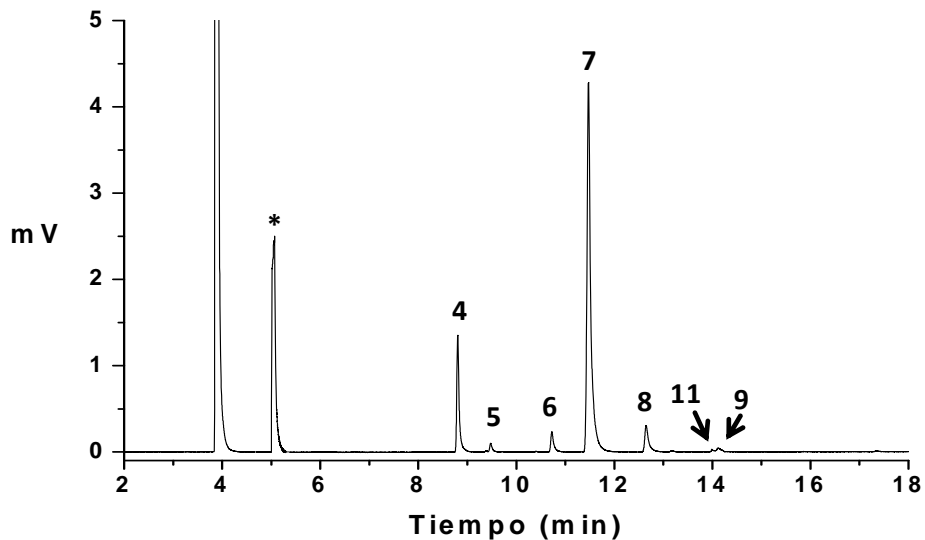
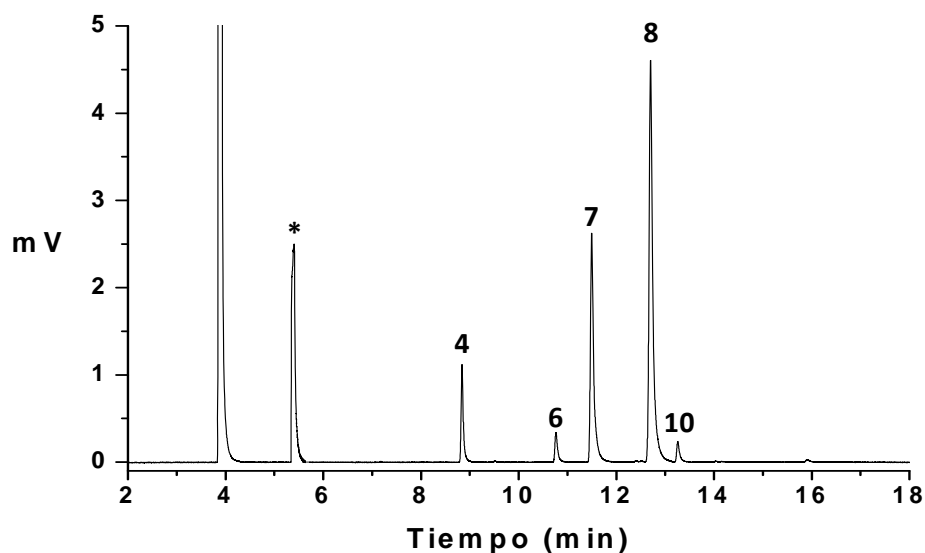


Figura V.16.- Cromatograma obtenido mediante el método optimizado GC-FID para una muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva sin usar (BAOL), según las condiciones de operación optimizadas para la reacción de transesterificación.



Figura

V.17.- Cromatograma obtenido mediante el método optimizado GC-FID para una muestra de biodiesel obtenida a partir de girasol de fritura (BAGF), según las condiciones de operación optimizadas para la reacción de transesterificación.

Como se observa en la Figura V.16, el pico mayoritario en la muestra BAOL se corresponde con el metil estearato (pico 7), mientras que en la muestra BAGL (Figura V.17) el pico mayoritario es el metil linoleato (pico 8).

Finalmente, se determinó el rendimiento de la reacción de transesterificación, definido como el porcentaje en masa del biodiesel obtenido (transesterificado, purificado y seco) relacionado con la masa inicial de aceite utilizado. Todas las muestras de biodiesel fueron obtenidas utilizando una masa de 600,2 g de aceite. El rendimiento se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$R(\%, m/m) = \frac{\text{masa del biodiesel obtenido (g)}}{\text{masa del aceite utilizado (g)}} \cdot 100$$

En la Tabla V.14 se recogen los contenidos individuales, los porcentajes totales de FAMES y los rendimientos obtenidos para cada uno de los biodiesel producidos mediante la reacción de transesterificación en las condiciones optimizadas descritas.

Tabla V.14.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes y rendimiento, en % (m/m), de la reacción de transesterificación para cada muestra de biodiesel.

FAMES	% FAMES							
	BAOL	BAOF	BAGL	BAGF	BASL	BASF	BACL	BACF
(C16:0)	9,5 \pm 0,3	9,1 \pm 0,4	6,59 \pm 0,07	5,83 \pm 0,05	9,04 \pm 0,03	10,85 \pm 0,01	10,79 \pm 0,06	8,21 \pm 0,09
(C16:1)	0,26 \pm 0,04	0,19 \pm 0,03	-	-	-	-	-	-
(C18:0)	1,47 \pm 0,03	1,61 \pm 0,04	1,52 \pm 0,05	0,94 \pm 0,02	1,34 \pm 0,02	1,63 \pm 0,07	0,87 \pm 0,04	0,55 \pm 0,06
(C18:1)	85 \pm 1	84 \pm 2	25 \pm 1	30 \pm 1	26 \pm 1	28 \pm 1	27 \pm 1	25 \pm 1
(C18:2)	3,7 \pm 0,1	3,1 \pm 0,6	65 \pm 1	61 \pm 1	60 \pm 1	56,4 \pm 0,9	60 \pm 1	60 \pm 2
(C18:3)	0,12 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	-	-	-	-	-	-
(C20:0)	-	-	1,8 \pm 0,4	0,80 \pm 0,01	3,05 \pm 0,06	1,17 \pm 0,06	0,48 \pm 0,02	0,58 \pm 0,01
(C20:1)	0,15 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	-	-	-	-	0,18 \pm 0,01	0,83 \pm 0,02
(C22:0)	-	-	-	-	0,12 \pm 0,01	0,85 \pm 0,09	-	-
% Total	99,9 \pm 1,4	98,7 \pm 1,7	99,9 \pm 1,9	98,8 \pm 1,8	99,4 \pm 1,9	98,4 \pm 1,5	99,7 \pm 1,8	94,3 \pm 1,9
R (%)	84,7	81,9	84,2	81,2	84,9	82,5	85,3	79,8

Cont. Tabla V.14.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes y rendimiento, en % (m/m), de la reacción de transesterificación para cada muestra de biodiesel.

FAMES	% FAMES					
	BAML	BAMF	BASGL	BASGF	BAOGF	BAOGMF
(C16:0)	10,79 \pm 0,04	7,53 \pm 0,09	10,83 \pm 0,07	9,46 \pm 0,09	8,8 \pm 0,9	9,6 \pm 0,1
(C16:1)	-	-	-	-	0,36 \pm 0,05	0,26 \pm 0,03
(C18:0)	0,89 \pm 0,02	0,83 \pm 0,04	1,95 \pm 0,08	2,18 \pm 0,05	1,82 \pm 0,07	0,75 \pm 0,01
(C18:1)	28 \pm 1	32 \pm 1	22 \pm 1	22 \pm 1	70 \pm 1	78 \pm 1
(C18:2)	60 \pm 2	58 \pm 1	59 \pm 1	58 \pm 1	18 \pm 1	9,05 \pm 0,05
(C18:3)	-	-	-	0,15 \pm 0,01	0,75 \pm 0,03	0,86 \pm 0,02
(C20:0)	0,34 \pm 0,06	0,24 \pm 0,04	4,7 \pm 0,3	4,89 \pm 0,08	0,11 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
(C20:1)	-	-	0,51 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02
(C22:0)	-	-	-	-	-	-
% Total	99,7 \pm 2,1	98,1 \pm 1,8	99,2 \pm 1,7	96,6 \pm 1,8	99,4 \pm 1,7	99,1 \pm 1,3
R (%)	86,2	84,1	85,2	80,1	84,8	85,2

Los resultados obtenidos para los porcentajes de los diferentes FAMES en las distintas muestras de biodiesel analizadas son del mismo orden que los encontrados por otros autores en la bibliografía consultada (Karaosmanoğlu *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 2001; Antolin *et al.*, 2002; Pereda Marín *et al.*, 2003; Tomasevic *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Cetinkaya *et al.*, 2004; Encinar *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2005; Georgogianni *et al.*, 2007; Issariyakul *et al.*, 2007, 2008; Vicente *et al.*, 2007a, 2007b; Phan *et al.*, 2008; Predojevic, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008, 2009; Bautista *et al.*, 2009; Demirbas, 2009; Ferella *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Sabudak *et al.*, 2010; Keera *et al.*, 2011).

Para el biodiesel obtenido a partir de aceites sin usar, se obtuvieron porcentajes totales de FAMES superiores al 99 %, y superiores al 98 % para la mayoría del biodiesel producido a partir de aceites de fritura. Son destacables las muestras de biodiesel procedentes de mezclas de aceites de fritura (BAOGF y BAOGMF), que presentan porcentajes de FAMES superiores al 99 % (99,4 y 99,1 %, respectivamente).

Como se observa en la Tabla V.14, las muestras de biodiesel procedentes de aceites de fritura presentan menores porcentajes de FAMES que las correspondientes a los aceites sin usar. Este hecho pone de manifiesto que durante el proceso de fritura al que son sometidos los aceites vegetales, éstos sufren cambios físicos y químicos debidos a las elevadas temperaturas, formándose productos no deseados que pueden afectar a la producción del biodiesel y a su calidad (Enweremadu *et al.*, 2009). Además, la mayoría de las muestras de biodiesel objeto de estudio cumplen con la normativa europea para el biodiesel UNE-EN 14214:2009, que establece un contenido mínimo de FAMES del 96,5 %, con la excepción de la muestra BACF (colza de fritura), cuyo porcentaje total de FAMES es 94,3 %.

Los rendimientos de la reacción de transesterificación varían entre 79,8 y 86,2 %, que resultan ser ligeramente superiores a los rendimientos obtenidos en la bibliografía consultada, en el que se emplean los mismos tipos de aceites aunque con condiciones de reacción diferentes.

V.4 Conclusiones

De la realización de este estudio se pueden destacar las siguientes conclusiones:

- A partir de la experimentación realizada, se encontró un tiempo de reacción óptimo de 80 minutos y una velocidad de agitación durante la reacción de transesterificación de 700 rpm. Asimismo, se determinó que el tiempo mínimo necesario para separar las fases obtenidas después de la reacción fue de 24 horas y que el lavado del biodiesel debe realizarse con una disolución acuosa de ácido fosfórico al 5 % (v/v), seguida de un proceso de secado en un evaporador centrífugo a 80 °C durante 2 horas.

- El empleo de aceites de fritura como materia prima requirió un proceso de deshidratación con MgSO_4 previo a la reacción de transesterificación alcalina, con objeto de eliminar los posibles restos de agua así como disminuir el índice de acidez de las muestras de aceite, lo que permitió obtener buenos rendimientos en dicha reacción.

- Se ha aplicado un diseño factorial de experimentos para optimizar el procedimiento de obtención del biodiesel, en el que se estudió la influencia de la temperatura de reacción, la relación molar metanol-aceite y la concentración de catalizador empleados en la reacción de transesterificación. Las condiciones óptimas para realizar la reacción de transesterificación encontradas fueron una temperatura de 65 °C, una concentración de catalizador (NaOH) del 1,0 % (m/m) y una relación molar metanol-aceite de 6,15:1.

- El modelo teórico propuesto mediante el diseño factorial de experimentos ajustó los valores experimentales sin que existan grandes desviaciones, siguiendo una distribución normal.

- Se ha comprobado que la temperatura de reacción es el factor que más influye en la producción del biodiesel, seguido de la concentración de catalizador y, finalmente, la relación molar metanol-aceite. La temperatura y la relación molar presentan efectos positivos sobre la reacción de transesterificación, mientras que la concentración de catalizador presenta efectos negativos al existir un valor por encima del cual el porcentaje de FAMES disminuye debido al aumento de las reacciones secundarias de saponificación.

- El biodiesel obtenido mediante el procedimiento optimizado para la reacción de transesterificación cumplió con la normativa europea respecto al contenido en FAMES. De esta forma, la aplicación de dicho procedimiento a diferentes tipos de aceites sin usar y de fritura permitió obtener porcentajes de FAMES en el biodiesel superiores, en la mayoría de los casos, al 98 % y con rendimientos de reacción entre el 79,8 y el 85,3 %.

CAPÍTULO VI

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting at the right end of the horizontal line. The horizontal line is black and the vertical line is grey.

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE
LAS MUESTRAS DE ACEITE
ESTUDIADAS Y DE BIODIESEL
OBTENIDAS MEDIANTE CATÁLISIS
HOMOGÉNEA A PARTIR DE
ELLAS. APLICACIÓN DE LA
NORMATIVA
UNE-EN 14214:2009**

Con objeto de evaluar la calidad de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea a partir de diferentes tipos de aceites vegetales, tanto sin usar como procedentes de procesos de fritura, se han determinado los parámetros correspondientes a los requisitos de calidad establecidos en la normativa europea UNE-EN 14214:2009. Asimismo, algunos de estos parámetros físico-químicos también se determinaron en las muestras de aceite empleadas como materia prima para la obtención de biodiesel con objeto de verificar la mayor o menor necesidad de conversión durante la reacción de transesterificación. A partir de los límites máximos y mínimos de los parámetros de calidad estudiados, se ha evaluado la idoneidad de las muestras de biodiesel obtenidas para ser empleadas como combustibles alternativos a los derivados del petróleo en los motores diésel.

VI.1 Antecedentes

Para garantizar el tiempo de vida y un correcto funcionamiento de los motores que utilizan biodiesel como combustible, se requiere un estricto control de calidad tanto durante como después de la reacción de transesterificación de los aceites vegetales, para obtener así un producto de calidad. La industria del biodiesel ha desarrollado, en los últimos años, un estricto protocolo de calidad para productores y distribuidores con objeto de asegurar que el biodiesel se produce según los datos específicos recogidos en la normativa, tanto europea como americana, y que fenómenos de contaminación o degradación no tienen lugar durante las etapas de almacenamiento, distribución o mezcla con el diésel convencional. La calidad del biodiesel depende en gran medida, por un lado, de las materias primas utilizadas (aceites vegetales o grasas animales) y de su composición en ácidos grasos, y por el otro, de los procesos de producción, purificación, neutralización, lavado, secado y almacenamiento.

La calidad del biodiesel debe ser controlada con rigor, ya que la presencia de determinados contaminantes puede provocar diferentes problemas en lo que respecta tanto a su obtención como a su empleo como combustible en los motores diésel. Por lo tanto, para ser aceptado como combustible, el biodiesel debe cumplir con las especificaciones impuestas por la normativa vigente. Además, la mezcla de biodiesel con gasóleo debe cumplir con los requisitos para combustibles minerales de automoción, recogidos en la norma europea UNE-EN 590:2009, según la cual se permite la mezcla con el gasóleo de automoción hasta un volumen máximo de FAMES del 7 %. Esto justifica que en diversos países, como los europeos, Estados Unidos, Brasil, Sudáfrica, Australia, etc. se disponga de normativas diferenciadas (ASTM D6751-09, UNE-EN 14214:2009) que regulan las especificaciones que deben cumplir los biocombustibles, con especial atención sobre los límites máximos y mínimos de los parámetros indicativos de la calidad (Knothe, 1999, 2006; Pereyra-Irujo *et al.*, 2009). No obstante, existe gran controversia en la bibliografía consultada al respecto para los parámetros que definen la calidad del biodiesel.

Mittelbach (1996) señaló la necesidad de distinguir entre unos parámetros generales y otros específicos para determinar la calidad de un biocombustible. Entre los parámetros generales, que también afectan a los combustibles fósiles, se encuentran: la densidad, la viscosidad cinemática, el punto de inflamación, el contenido en azufre, el residuo carbonoso Conradson, el contenido en cenizas sulfatadas, el número de cetano y el índice de neutralización. Entre los parámetros específicos, se encuentran: la composición química y pureza de los FAMES, y el contenido en metanol, glicerina libre y total, y fósforo. De esta forma, la densidad, el número de cetano y el contenido en azufre dependen del tipo de aceite empleado en la reacción de transesterificación; el punto de inflamación, del contenido en metanol; la viscosidad, de los triglicéridos que no han reaccionado; el residuo carbonoso Conradson, del contenido en glicéridos, FFA, jabón, restos de catalizador y otras impurezas; el

contenido en cenizas, de las impurezas y restos de catalizador presentes en el biodiesel; y el contenido en fósforo, del grado de refinado de la materia prima.

Ramos *et al.* (2009) propusieron que el grado de cumplimiento de algunos de los parámetros especificados en la norma UNE-EN 14214:2009, como son el contenido en FAMES, la viscosidad cinemática, el índice de acidez, el contenido en glicerina y en mono-, di- y triglicéridos, y el punto de inflamación, dependen del grado de refinamiento del aceite, de la reacción de transesterificación y de la calidad del proceso de purificación del biodiesel. Sin embargo, existen otros parámetros críticos, como el número de cetano, la estabilidad a la oxidación, el índice de yodo y el punto de obstrucción de filtro en frío, que son función de la composición en FAMES de cada biodiesel.

En el marco de la Unión Europea, la norma UNE-EN 14214:2009 recoge los parámetros que debe cumplir el biodiesel para poder ser comercializado en sus Estados Miembros, estableciendo estrictos requisitos de tolerancia para un total de 25 parámetros físico-químicos diferentes del producto. Cuando se cumplen las especificaciones, el biodiesel puede ser utilizado en la mayoría de los motores modernos, sin sufrir modificaciones y conservando la durabilidad y fiabilidad de los mismos. Incluso cuando se emplean mezclas con diésel utilizando bajos porcentajes de biodiesel, es necesario que éste cumpla con la normativa antes de ser mezclado, para asegurar la calidad del mismo.

Aunque existen diversas normas de calidad para el biodiesel, la mayor parte de ellas se basan en la norma europea UNE-EN 14214:2009 y la americana ASTM D6751-09. Las diferencias entre ambas no sólo incluyen los parámetros de calidad considerados y sus valores límite, sino también los métodos de medida, que aunque en muchos casos se trata de técnicas similares, en otros se emplean procedimientos analíticos distintos, lo que implica una difícil comparación entre los valores límite de dichos parámetros. Otra diferencia importante entre las especificaciones técnicas europeas y americanas se encuentra en el hecho de que la norma ASTM D6751-09 es aplicable tanto a los ésteres metílicos como etílicos de ácidos grasos (FAMES y FAEEs), mientras que la norma UNE-EN 14214:2009 sólo es de aplicación para los FAMES.

Es necesario tener en cuenta que las especificaciones técnicas del biodiesel han sido diseñadas en función de las materias primas disponibles en cada región y de las características de los mercados locales, por lo que el biodiesel producido en otros lugares, obtenido a partir de una materia prima diferente, puede no cumplir con las especificaciones técnicas del país receptor, lo que constituye una barrera para su comercio internacional. En algunos casos, la única forma de salvaguardar estas diferencias se encuentra en la mezcla de distintos biodiesel producidos a partir de diferentes materias primas. Con objeto de eliminar esta barrera para su comercio internacional, la Unión Europea, Estados Unidos y Brasil intentaron alcanzar un acuerdo que promoviera, dentro de lo posible, la compatibilidad de las especificaciones técnicas en sus respectivas regiones, publicando sus conclusiones en el libro "*White Paper on*

Internationally Compatible Biofuel Standards” (2007). En él, las especificaciones técnicas se clasifican en tres categorías, en función de la dificultad encontrada en la posible unificación de las distintas normativas:

- Categoría A: Especificaciones similares
- Categoría B: Especificaciones con diferencias significativas entre los parámetros y métodos de medida, pero que podrían ser unificadas
- Categoría C: Especificaciones con diferencias fundamentales, posiblemente debido a regulaciones sobre emisiones o protección del medio ambiente, que no parecen ser salvables en un futuro inmediato

En la Tabla VI.1 se recogen las distintas especificaciones del biodiesel en función de las categorías indicadas anteriormente.

Tabla VI.1.- Clasificación de las especificaciones del biodiesel según categorías.

Categoría A	Categoría B	Categoría C
Cenizas sulfatadas	Contenido en glicerol total	Contenido en azufre
Contenido en metales alcalinos y alcalino-térreos	Contenido en fósforo	Punto de obstrucción de filtro en frío
Contenido en glicerol libre	Residuo carbonoso	Índice de cetano
Corrosión a la tira de cobre	Contenido en FAMES	Estabilidad a la oxidación
Contenido en metanol	Temperatura de destilación	Contenidos en mono-, di- y triglicéridos
Índice de acidez	Punto de inflamación	Densidad
	Contaminación total	Viscosidad cinemática
	Contenido en agua y sedimentos	Índice de yodo
		Contenido en ácido linoléico
		Contenido en ésteres metílicos del ácido linoléico

En la Tabla VI.2 se muestran los límites máximos y mínimos de las distintas especificaciones que debe cumplir el biodiesel, en función de la normativa europea (UNE-EN 590:2009 para diésel y UNE-EN 14214:2009+A1=2010 para biodiesel), americana (ASTM D6751-09) y brasileña (ANP 255:2008). En la Tabla VI.3 se muestran los valores máximos, en °C, para el punto de obstrucción de filtro en frío (POFF), que dependen de la región, clima y estación del año, establecidos según la norma UNE-EN 116:2006, puesto que no existe una norma específica para el biodiesel en la norma UNE-EN 14214:2009.

Tabla VI.2.- Límites máximos y mínimos de las distintas especificaciones del biodiesel según diferentes normativas.

Parámetro	Unidades	UNE-EN 590:2009		ASTM D6751:2009		UNE-EN 14214:2009		ANP 255:2008	
		Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Densidad (a 15 °C)	kg m ⁻³	820,0	845,0	-	-	860	900	850 ^a	900 ^a
Viscosidad cinemática (a 40 °C)	mm ² s ⁻¹	2,00	4,50	1,9	6,0	3,50	5,00	3,0	6,0
Punto de Inflamación	°C	55	-	130,0	-	101,0	-	100	-
Punto de obstrucción de filtro en frío	°C	-	-	Según clima		Según clima ^b		Según clima	
Contenido en azufre	µg g ⁻¹	-	10,0	-	15 ^c ; 50 ^d	-	10,0	-	10,0
Residuo carbonoso	% (m/m)	-	0,30	-	0,05	-	0,30	-	0,05
Número de cetano	-	51,0	-	47,0	-	51,0	-	45,0	-
Índice de cetano	-	46,0	-			-	-	-	-
Contenido en agua y sedimentos	% (v/v)			-	0,05	-	-	-	0,020
Estabilidad a la oxidación (a 110 °C)	horas	20 ^e	25 ^e	3,0	-	6,0	-	6,0	-
% (v/v) destilado a 250 °C	% (v/v)	-	65	-	-	-	-	-	-
% (v/v) destilado a 350 °C		85	-	-	-	-	-	-	-
95 % (v/v) recogido a	°C	-	360	-	360	-	-	-	360
Contenido en agua	µg g ⁻¹	-	200	-	-	-	500	-	500
Contaminación total	µg g ⁻¹	-	24	-	-	-	24	-	24
Corrosión a la tira de cobre (3 h; 50 °C)	Clasificación	Clase 1		Clase 3		Clase 1		Clase 1	
Contenido en cenizas sulfatadas	% (m/m)	-	0,01	-	0,02	-	0,02	-	0,02
Índice de acidez	mg KOH g ⁻¹	-	-	-	0,50	-	0,50	-	0,80

Cont. Tabla VI.2.- Límites máximos y mínimos de las distintas especificaciones del biodiesel según diferentes normativas.

Parámetro	Unidades	UNE-EN 590:2009		ASTM D6751:2009		UNE-EN 14214:2009		ANP 255:2008	
		Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Contenido en metanol	% (m/m)	-	-	-	0,20	-	0,20	-	0,50
Contenido en monoglicéridos	% (m/m)	-	-	-	-	-	0,80	-	1,00
Contenido en diglicéridos		-	-	-	-	-	0,20	-	0,25
Contenido en triglicéridos		-	-	-	-	-	0,20	-	0,25
Contenido en glicerol libre	% (m/m)	-	-	-	0,02	-	0,02	-	0,02
Contenido en glicerol total		-	-	-	0,24	-	0,20	-	0,38
Contenido en FAMES	% (m/m)	-	7,0 ^f	-	-	96,5	-	96,5	-
Ester metílico de ácido linoléico	% (m/m)	-	-	-	-	-	12,0	-	-
Ésteres metílicos poli-insaturados (≥ 4 dobles enlaces)	% (m/m)	-	-	-	-	-	1,00	-	-
Índice de yodo	$\text{g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$	-	-	-	-	-	120 ^e	-	-
Contenido en fósforo	$\mu\text{g g}^{-1}$	-	-	-	10,0	-	4,0	-	10,0
Metales del grupo I (Na+K)	$\mu\text{g g}^{-1}$	-	-	-	5,0	-	5,0	-	5,0
Metales del grupo II (Ca+Mg)	$\mu\text{g g}^{-1}$	-	-	-	5,0	-	5,0	-	5,0
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	% (m/m)	-	11	-	-	-	-	-	-

^a Densidad a 20°C.

^b Ver Tabla VI.3.

^c Contenido en azufre: Grado S15 y ^d Grado S500.

^e Estabilidad a la oxidación (a 110 °C) en g m^{-3} .

^f Contenido en FAMES en % (v/v).

^g Índice de yodo = $140 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ para España, según Real Decreto 31/2006.

Tabla VI.3.- Valores máximos, en °C, para el punto de obstrucción de filtro en frío (POFF) según la norma UNE-EN 116:1998.

Tipo de clima	POFF (°C)					
	Grado A	Grado B	Grado C	Grado D	Grado E	Grado F
Cálido	+5	0	-5	-10	-15	-20
	Clase 0	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	
Ártico	-20	-26	-32	-38	-44	

En cualquier caso, el control de la calidad es muy complejo, ya que como se puede observar en la Tabla VI.2, existen serias discrepancias entre los distintos países encargados de la normalización. En la actualidad no existe un consenso total, a nivel mundial, en cuanto a la totalidad de las especificaciones del biodiesel, debido a que es posible que un biodiesel que cumpla con la normativa europea UNE-EN 14214:2009 y que puede ser comercializado en Europa, no verifique la normativa de otros países, como Brasil, no pudiendo ser comercializado en esas regiones.

En la Tabla VI.4, se recogen las normas específicas (europea, americana o brasileña) para la determinación de cada uno de los parámetros de calidad que debe cumplir el biodiesel para ser empleado como biocombustible, así como los que debe cumplir el diesel convencional para ser comercializado, según la normativa europea UNE-EN 590:2009.

Tabla VI.4.- Métodos de ensayo y normas utilizados para determinar las especificaciones del biodiésel y del diésel convencional.

Parámetro	Métodos de ensayo			
	UNE-EN 590	EUROPEA	AMERICANA	BRASILEÑA
Densidad (a 15 °C)	UNE-EN ISO 3675	UNE-EN ISO 3675	ASTM D1298	ABNT NBR 7148
	UNE-EN ISO 12185	UNE-EN ISO 12185	ASTM D4052	ABNT NBR 14065
Viscosidad cinemática (a 40 °C)	UNE-EN ISO 3104	UNE-EN ISO 3104	ASTM D445	ABNT NBR 10441
Punto de Inflamación	UNE-EN ISO 2719	UNE-EN ISO 2719	ASTM D93	ABNT NBR 14598
		UNE-EN ISO 3679		
Punto de Obstrucción de Filtro en Frío	UNE-EN 116	UNE-EN 116	ASTM D6371	ABNT NBR 14747
Contenido en Azufre	UNE-EN ISO 20846	UNE-EN ISO 20846	ASTM D5453	ASTM D5453
	UNE-EN ISO 20884	UNE-EN ISO 20884		
Residuo carbonoso	UNE-EN ISO 10370	UNE-EN ISO 10370	ASTM D4530	ASTM D4530
Número de cetano	UNE-EN ISO 5165	UNE-EN ISO 5165	ASTM D613	ASTM D613
	UNE-EN 15195			
Índice de cetano	UNE-EN ISO 4264	UNE-EN ISO 4264	ASTM D4737	-
Contenido en agua y sedimentos	-	-	ASTM D2709	ASTM D2709
Estabilidad a la oxidación (a 110 °C)	UNE-EN ISO 12205	UNE-EN 15751	UNE-EN 14112	UNE-EN 14112
	UNE-EN 15751	UNE-EN 14112		
% (v/v) destilado a 250 °C	EN ISO 3405	EN ISO 3405	ASTM D1160	ASTM D1160
% (v/v) destilado a 350 °C				
95 % (v/v) recogido a				
Contenido en agua	UNE-EN ISO 12937	UNE-EN ISO 12937	-	-
Contaminación total	UNE-EN 12662	UNE-EN 12662	-	-
Corrosión de la tira de cobre (3 h a 50 °C)	UNE-EN ISO 2160	UNE-EN ISO 2160	ASTM D130	ABNT NBR 14359
Contenido en cenizas sulfatadas	UNE-EN ISO 6245	ISO 3987	ASTM D874	ABNT NBR 9842

Cont. Tabla VI.4.- Métodos de ensayo y normas utilizados para determinar las especificaciones del biodiesel y del diésel convencional.

Parámetro	Métodos de ensayo			
	UNE-EN 590	EUROPEA	AMERICANA	BRASILEÑA
Índice de acidez	-	UNE-EN 14104	ASTM D664	ABNT NBR 14448
Contenido en metanol	-	UNE-EN 14110	UNE-EN 14110	ABNT NBR 15343
Contenido en monoglicéridos	-	UNE-EN 14105	-	ABNT NBR 15342
Contenido en diglicéridos	-		-	
Contenido en triglicéridos	-		-	ABNT NBR 15344
Contenido en glicerol libre	-	UNE-EN 14105	ASTM D6584	ABNT NBR 15341
		UNE-EN 14106		
Contenido en glicerol total	-	UNE-EN 14105	ASTM D6584	ABNT NBR 15344
Contenido en FAMES	UNE-EN 14078	UNE-EN 14103	-	ABNT NBR 15342
Ester metílico de ácido linolénico	-	UNE-EN 14103	-	-
Ésteres metílicos poli-insaturados (≥ 4 dobles enlaces)	-	UNE-EN 15779	-	-
Índice de yodo	-	UNE-EN 14111	-	UNE-EN 14111
Contenido en fósforo	-	UNE-EN 14107	ASTM D4951	ASTM D4951
Metales del grupo I (Na+K)	-	UNE-EN 14108	UNE-EN 14538	-
		UNE-EN 14109		
		UNE-EN 14538		
Metales del grupo II (Ca+Mg)	-	UNE-EN 14538	UNE-EN 14538	-
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	UNE-EN 12916	-	-	-

VI.2 Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de aceite utilizadas y de las muestras de biodiesel producidas

Con objeto de caracterizar tanto las muestras de aceite como las de biodiesel obtenidas, mediante catálisis homogénea alcalina, a partir de ellas se determinaron una serie de propiedades físicas y químicas. En el caso de las muestras de biodiesel, el principal objetivo de estos ensayos consistía en verificar el estricto cumplimiento de las especificaciones recogidas en la normativa europea UNE-EN 14214:2009.

En las muestras de aceite se determinaron los siguientes parámetros:

- Densidad
- Viscosidad cinemática
- Índice de acidez
- Índice de yodo
- Índice de peróxidos
- Contenido en agua y materias volátiles

Los parámetros determinados en las muestras de biodiesel fueron:

- Densidad
- Viscosidad cinemática
- Índice de acidez
- Índice de yodo
- Contenido en agua
- Volatilidad y curva de destilación
- Índice de cetano
- Punto de obstrucción de filtro en frío
- Punto de inflamación o ignición
- Contenido en azufre
- Contenido en cenizas sulfatadas
- Residuo carbonoso Conradson
- Corrosión a la tira de cobre
- Índice de peróxidos y estabilidad a la oxidación

VI.2.1 Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de aceite

En general, los aceites no pueden ser empleados como combustibles sin una transformación previa y su utilización para ser convertidos en biocombustibles, mediante la reacción de transesterificación, estará en función de su contenido en triglicéridos. Con objeto de evaluar la utilidad de las muestras de aceite empleadas como materia prima para la producción de biocombustibles alternativos a los de origen fósil se pretende comprobar si dichos aceites cumplen con los requisitos mínimos necesarios para su transformación en biodiesel. Se puede prever la mayor o menor necesidad de conversión del aceite a partir del conocimiento de sus principales propiedades físico-químicas. Los ensayos realizados para la caracterización de las muestras de aceite se encuentran descritos en la sección III.4.3.

VI.2.1.1 Densidad

Los resultados obtenidos para la densidad a 15 °C de las muestras de aceite, mediante densímetro de inmersión, picnómetro y densímetro digital, se muestran en la Figura VI.1.

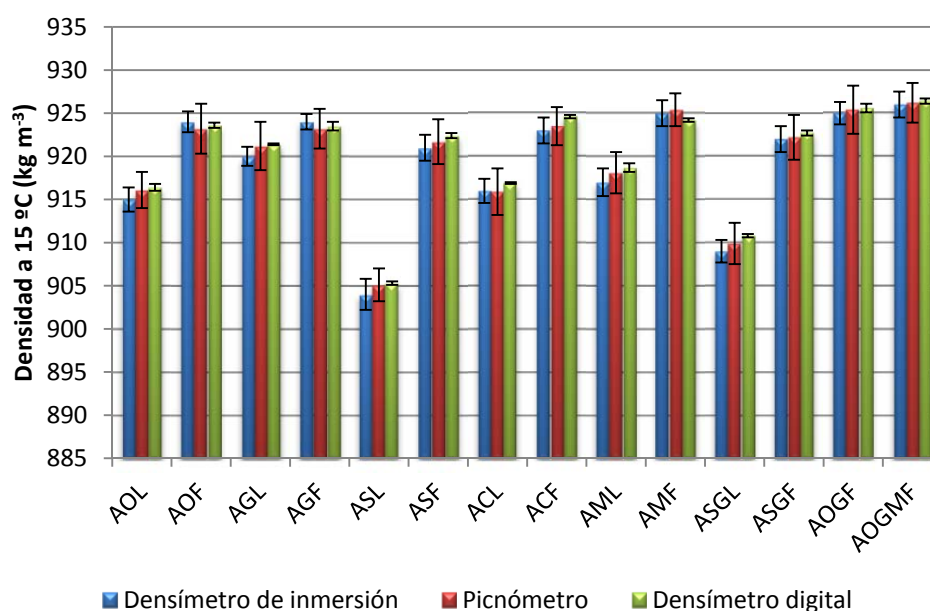


Figura VI.1.- Densidad a 15 °C, en kg m⁻³ (media ± desviación estándar, n=3), de los aceites estudiados mediante los tres métodos empleados.

Las muestras de aceite sin usar de diferente procedencia presentan valores de densidad comprendidos entre 905,3 y 921,4 kg m⁻³, mientras que las muestras de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 922,4 y 924,6 kg m⁻³. Asimismo, se observa que las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan valores muy similares entre sí (925,6 y 926,4 kg m⁻³). En cualquier caso, los valores obtenidos están dentro del intervalo establecido por diferentes autores para estos aceites (Srivastava *et al.*, 2000; Altin *et al.*, 2001; Ramadhas *et al.*, 2004; Barnwal *et al.*, 2005;

Rakopoulos *et al.*, 2006; Demirbas, 2008; San José Alonso *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos mediante el uso del densímetro de inmersión fueron, en la mayoría de los casos, ligeramente inferiores a los obtenidos mediante el picnómetro, y éstos a su vez, inferiores a los obtenidos mediante el densímetro digital, si bien las diferencias encontradas entre los tres métodos de medida de la densidad no son significativas. Dado que los resultados obtenidos mediante el densímetro digital fueron los más reproducibles, se utilizaron dichos valores de densidad.

Como se observa en la Figura VI.1, todas las muestras de aceite de fritura presentaron valores más elevados que los correspondientes a las muestras de aceite sin usar de la misma procedencia, posiblemente como consecuencia de la formación de compuestos polimerizados durante el proceso de fritura, principalmente triglicéridos polimerizados, debido a las elevadas temperaturas a las que se someten los aceites (Issariyakul *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2008). En el aceite de fritura, se producen cambios físicos y químicos, como consecuencia de su interacción con el agua y otros compuestos presentes en los alimentos que se han cocinado en ella. Se observa que las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan los valores de densidad más elevados de todas las muestras estudiadas debido a que han sido sometidas a un calentamiento prolongado

VI.2.1.2 Viscosidad cinemática

La viscosidad es el principal inconveniente que presentan los aceites para ser utilizados como biocombustibles, ya que da lugar a una combustión incompleta, aumento de las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos, obstrucción en las toberas de los inyectores, depósitos carbonosos en el motor y ensuciamiento del aceite lubricante del cárter. Esto se debe, fundamentalmente, a la escasa atomización del aceite como biocombustible durante la inyección, a causa de su elevada viscosidad.

Además, los aceites no pueden emplearse en climas fríos como biocombustibles, sin modificación química, ya que la viscosidad aumenta aún más al disminuir la temperatura (Alptekin *et al.*, 2008). Los aceites vegetales presentan viscosidades que pueden llegar a ser entre 9 y 17 veces superiores a la de los combustibles derivados del petróleo (Meher *et al.*, 2006b; Demirbas, 2008; Balat *et al.*, 2010; Çelikten *et al.*, 2010). Como se ha comentado anteriormente, para resolver este inconveniente, el aceite necesita ser modificado químicamente, principalmente mediante procesos de transesterificación, pirólisis o emulsión. De todos ellos, la reacción de transesterificación es el proceso que produce biocombustibles de forma más limpia y respetuosa con el medio ambiente.

Por otra parte, el calentamiento prolongado de los aceites a elevadas temperaturas durante el proceso de fritura, en presencia de humedad y del oxígeno liberado por los alimentos, causan la oxidación del aceite con la consecuente formación de carbonilos volátiles,

hidroxiácidos, cetoácidos y epoxiácidos, que producen el oscurecimiento del aceite. La polimerización de las moléculas de aceite produce componentes cíclicos y polímeros de elevado peso molecular (triglicéridos polimerizados) los cuales producen el aumento de la viscosidad de los aceites sometidos a procesos de fritura (Ma *et al.*, 1999; Mittelbach *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 2000; Benedito *et al.*, 2002; Innawong *et al.*, 2004; Ramadhas *et al.*, 2005; Knothe, 2006; Bouaid *et al.*, 2007; Ruiz-Méndez *et al.*, 2008; Enweremadu *et al.*, 2009; Balat *et al.*, 2010).

En la Tabla VI.5 se recogen los resultados obtenidos para la viscosidad cinemática a 40 °C de las muestras de aceite estudiadas.

Tabla VI.5.- Viscosidad cinemática a 40 °C, en cSt (media \pm desviación estándar, n=3), de los aceites estudiados.

Aceite	Viscosidad cinemática a 40 °C (cSt)
AOL	39,62 \pm 0,56
AOF	43,85 \pm 0,78
AGL	26,98 \pm 0,42
AGF	54,49 \pm 0,56
ASL	36,23 \pm 0,59
ASF	41,96 \pm 1,23
ACL	39,53 \pm 0,42
ACF	48,62 \pm 0,96
AML	34,28 \pm 0,26
AMF	41,26 \pm 0,68
ASGL	33,47 \pm 0,42
ASGF	56,23 \pm 1,52
AOGF	66,26 \pm 1,42
AOGMF	62,31 \pm 1,86

Como se observa en la Tabla VI.5, y siguiendo una tendencia similar a la observada para los valores de densidad obtenidos, la viscosidad cinemática de las muestras de aceite sin usar es inferior a la de las muestras de aceite de fritura. Las muestras de aceite sin usar de diferente procedencia presentan valores de viscosidad cinemática comprendidos entre 26,98 y 39,62 cSt, mientras que las muestras de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 41,26 y 56,23 cSt. Del mismo modo, se observa que las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan valores similares entre sí (62,31 y 66,26 cSt). Los valores de viscosidad cinemática obtenidos para estos tipos de aceite, ya sean sin usar como de fritura, son concordantes con los valores encontrados en la bibliografía consultada (Altin *et al.*, 2001; Ramadhas *et al.*, 2004; Barnwal *et al.*, 2005; Demirbas, 2008; Grau *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010).

VI.2.1.3 Índice de acidez

La acidez es una medida del contenido de los FFA tanto en las muestras de aceite como en las de biodiesel. Por lo tanto, el contenido en estos ácidos grasos se expresa mediante la acidez calculada según el método convencional y se expresa como grado o índice de acidez. Su determinación resulta imprescindible, puesto que la acidez es un factor limitante para llevar a cabo la reacción de transesterificación de los aceites, ya que un elevado índice de acidez impediría el éxito de la reacción (Zhang *et al.*, 2003a, 2003b; Haas *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006; Çaylı *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Berrios *et al.*, 2010; Lianhua *et al.*, 2010; Sabudak *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos para el índice de acidez de las muestras de aceite estudiadas, según el procedimiento descrito en la sección III.4.3, se muestran en la Figura VI.2.

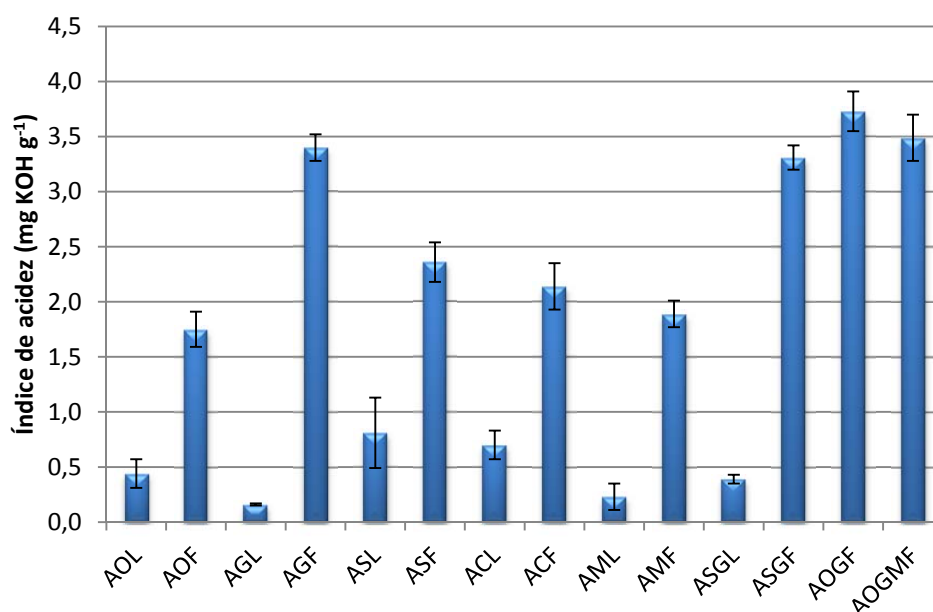


Figura VI.2.- Índice de acidez, en mg KOH g⁻¹ (media ± desviación estándar, n=3), de los aceites estudiados.

Las muestras de aceite sin usar presentan valores de índice de acidez comprendidos entre 0,16 y 0,81 mg KOH g⁻¹, mientras que las muestras de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 1,75 y 3,40 mg KOH g⁻¹. Las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan valores muy similares entre sí (3,73 y 3,49 mg KOH g⁻¹). Los valores obtenidos se encuentran en el intervalo definido en la bibliografía para estos tipos de aceites (Marchetti *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007a; Alptekin *et al.*, 2008; Gui *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Hingu *et al.*, 2010). A la vista de los resultados obtenidos, se observa que los procesos de fritura contribuyen a la formación de FFA (Cvengros *et al.*, 2004; Issariyakul *et al.*, 2008).

En la Figura VI.2 se observa que los valores de índice de acidez obtenidos para todas las muestras de aceite sin usar son inferiores a 1 mg KOH g^{-1} , por lo que estas muestras pueden ser empleadas como materia prima en la reacción de transesterificación. Si el índice de acidez fuese superior a 1 mg KOH g^{-1} , sería necesario utilizar una mayor concentración de catalizador para poder neutralizar los FFA, produciendo cantidades considerables de jabón y agua, por lo que en la reacción de transesterificación no se obtendrían porcentajes de FAMES satisfactorios (Zhang *et al.*, 2003a; Barnwal *et al.*, 2005; Balat *et al.*, 2010). Sin embargo, algunos autores han realizado con éxito la catálisis alcalina para aceites de fritura con un índice de acidez de $3,40 \text{ mg KOH g}^{-1}$ (Anwar *et al.*, 2010), de $3,80 \text{ mg KOH g}^{-1}$ (Sarin *et al.*, 2010) y de hasta $4,91 \text{ mg KOH g}^{-1}$ (Tomasevic *et al.*, 2003).

Cuando el valor del índice de acidez en los aceites es elevado es necesaria una etapa previa a la reacción de transesterificación, consistente en una esterificación catalizada por H_2SO_4 , que permite disminuir el índice de acidez a valores inferiores a 1 mg KOH g^{-1} , con lo que estos aceites se pueden utilizar como materia prima para la producción de biodiesel mediante catálisis alcalina (Ghadge *et al.*, 2005; Sahoo *et al.*, 2007; Predojevic *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Rajendra *et al.*, 2009; Janaun *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Además, se consigue que el índice de acidez de las muestras de biodiesel obtenidas se encuentre en los límites establecidos en la norma UNE-EN 14214:2009 (Issariyakul *et al.*, 2007).

Según experimentos de Felizardo *et al.* (2006) y Trujillo Hernández (2009), las muestras de aceite de fritura sometidas a deshidratación con MgSO_4 anhidro dan lugar, además de a la pérdida de agua, a una disminución del índice de acidez del aceite. Con objeto de evitar la realización de una reacción de esterificación ácida previa a la catálisis alcalina, y obtener mayores porcentajes de FAMES, las muestras de aceite de fritura se sometieron a una deshidratación con MgSO_4 anhidro y, posteriormente, se filtraron a vacío para eliminar cualquier materia en suspensión y los restos de MgSO_4 . En la Tabla VI.6 se muestran los valores de índice de acidez de las muestras de aceite de fritura sometidas a deshidratación con MgSO_4 .

Tabla VI.6.- Índice de acidez, en mg KOH g^{-1} (media \pm desviación estándar, $n=3$), para los aceites de fritura sometidos a un proceso de deshidratación con MgSO_4 .

Aceite	Índice de acidez (mg KOH g^{-1})
AOF	$0,53 \pm 0,06$
AGF	$0,82 \pm 0,18$
ASF	$0,76 \pm 0,12$
ACF	$0,44 \pm 0,05$
AMF	$0,86 \pm 0,15$
ASGF	$0,71 \pm 0,08$
AOGF	$0,93 \pm 0,16$
AOGMF	$0,89 \pm 0,11$

Como se observa en la Tabla VI.6, los índices de acidez de las muestras aceite de fritura sometidos a deshidratación con MgSO_4 han disminuido considerablemente a valores inferiores a 1 mg KOH g^{-1} , por lo que serían adecuadas para ser empleadas como materia prima en la producción de biodiesel.

VI.2.1.4 Índice de yodo

Este parámetro indica el nivel de insaturación que poseen los ácidos grasos presentes en las muestras de aceite y biodiesel, y una mayor proporción de dobles enlaces supone una mayor tendencia a la oxidación debido a la escasez de átomos de hidrógeno en su composición. Un aceite con un alto grado de insaturaciones conduce a la obtención de un biodiesel con un menor índice de cetano, que es una de las propiedades fundamentales para asegurar la calidad de la combustión de un biodiesel en el motor (Mittelbach, 1996). En los puntos donde se encuentran las insaturaciones, las cadenas son atacadas por el oxígeno, dando lugar a la formación de peróxidos y, a partir de éstos, se producen polímeros entre las distintas cadenas de ácidos grasos. Estos polímeros producen la formación de depósitos sólidos en el motor o al deterioro del aceite lubricante cuando las muestras son transformadas en biodiesel mediante la reacción de transesterificación. Este efecto se incrementa a mayor cantidad de insaturaciones presentes en el ácido graso, y por lo tanto, a mayor índice de yodo. En la Tabla VI.7 se recogen los valores de índice de yodo obtenidos para las muestras de aceite estudiadas.

Tabla VI.7.- Índice de yodo, en $\text{g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ (media \pm desviación estándar, $n=3$), de los aceites estudiados.

Aceite	Índice de yodo ($\text{g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$)
AOL	$87,8 \pm 0,2$
AOF	$95,2 \pm 0,6$
AGL	136 ± 1
AGF	$139,7 \pm 0,9$
ASL	102 ± 1
ASF	114 ± 1
ACL	105 ± 1
ACF	114 ± 1
AML	119 ± 1
AMF	$125,1 \pm 0,2$
ASGL	130 ± 1
ASGF	132 ± 1
AOGF	$134,2 \pm 0,5$
AOGMF	141 ± 1

Las muestras de aceite sin usar presentan valores del índice de yodo comprendidos entre $87,8$ y $136 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$, mientras que las muestras de aceite procedentes de los procesos

de fritura presentaron valores comprendidos entre 95,2 y 139,7 g I₂ [100 g]⁻¹. Asimismo, se observa que las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan valores muy similares entre sí (134,2 y 141 g I₂ [100 g]⁻¹), siguiendo la tendencia observada en los anteriores parámetros estudiados. Los valores de índice de yodo obtenidos para este tipo de muestras se encuentran dentro del intervalo determinado por diversos autores en la bibliografía (Tomasevic *et al.*, 2003; Szybist *et al.*, 2005; Wyatt *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2008; Winayanuwattikun *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Helwani *et al.*, 2009; Balat *et al.*, 2010; Ferella *et al.*, 2010).

Se observa que el aceite de girasol presenta valores del índice de yodo superiores a los de otras materias primas estudiadas, como por ejemplo el aceite de colza, ya que el aceite de girasol presenta elevados niveles de ácidos grasos insaturados, como resultado de su elevado contenido en ácido linoleico (dos enlaces dobles), mientras que el aceite de colza presenta un menor contenido de ácidos grasos no saturados (Vicente *et al.*, 2004).

Por otro lado, se observa que los valores de índice de yodo de los aceites de fritura son superiores a los de los aceites sin usar de igual procedencia. Esto es debido a que, durante los procesos de fritura, el aceite es sometido repetidamente a elevadas temperaturas en presencia de aire y humedad. Como se ha comentado, bajo estas condiciones, se producen reacciones de degradación, como autooxidación, polimerización, oxidación térmica e hidrólisis (Felizardo *et al.*, 2006; Predojevic, 2008). Estas reacciones de degradación hacen que los valores de índice de yodo de las muestras de aceite procedentes de procesos de fritura sean ligeramente superiores a los índices de yodo obtenidos para los aceites sin usar.

VI.2.1.5 Índice de peróxidos

El índice de peróxidos es una medida del grado de oxidación primaria que ha sufrido un aceite desde el momento de su producción y es un indicativo del estado de conservación del mismo. La presencia de oxígeno afecta notablemente a la calidad del aceite, ya que provoca la formación de radicales peróxido e hidroperóxido. Los peróxidos son los productos de descomposición primaria de la oxidación de las grasas, cualquiera que sea su composición. Se forman en los puntos de insaturación de las cadenas de carbonos de los ácidos grasos. Como resultado de la autooxidación se forman hidroperóxidos muy reactivos descomponiéndose en una gama muy amplia de sustancias, entre las cuales se encuentran polímeros de alto peso molecular.

Por otra parte, al aumentar la temperatura a la que es sometida el aceite durante el proceso de fritura, también lo hará la descomposición de los peróxidos, aumentando el grado de polimerización y originando diversos productos de oxidación, tales como aldehídos saturados e insaturados, cetonas, hidrocarburos, lactonas, alcoholes, ácidos y ésteres (Cvengros *et al.*, 2004; Encinar *et al.*, 2005; Berrios *et al.*, 2010). En cualquier caso, el índice de

peróxidos no es un factor tan decisivo como la acidez, si se trata de estudiar la viabilidad de la conversión de los aceites en biodiesel.

Los resultados obtenidos para el índice de peróxidos de las muestras de aceite estudiadas se muestran en la Figura VI.3.

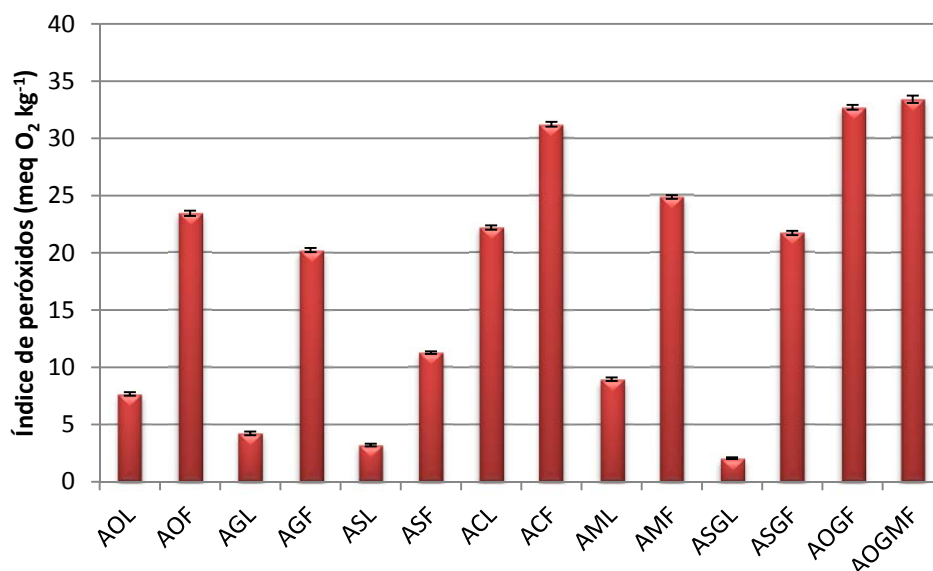


Figura VI.3.- Índice de peróxidos, en meq O₂ kg⁻¹ muestra (media ± desviación estándar, n=3), de los aceites estudiados.

Las muestras de aceite sin usar presentan valores de índice de peróxidos comprendidos entre 2,06 y 8,96 meq O₂ kg⁻¹, mientras que las de aceite derivadas de los procesos de fritura presentaron valores comprendidos entre 11,28 y 31,23 meq O₂ kg⁻¹. Del mismo modo, se observa que las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan valores muy similares entre sí (32,72 y 33,41 meq O₂ kg⁻¹), como ha ocurrido para los otros parámetros estudiados. Los valores de índice de peróxidos obtenidos para este tipo de muestras están en concordancia con los descritos por otros autores (Tomasevic *et al.*, 2003; Cvengros *et al.*, 2004; Olivera *et al.*, 2006a; Zheng *et al.*, 2006; Ruiz-Méndez *et al.*, 2008; Bouaid *et al.*, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Pinzi *et al.*, 2009; Berrios *et al.*, 2010; Cerchiara *et al.*, 2010).

Como se observa en la Figura VI.3, y siguiendo la misma tendencia observada para los otros parámetros estudiados, los valores del índice de peróxidos de las muestras de aceite sin usar son considerablemente inferiores a los de las muestras de aceite de fritura. El proceso de fritura de los alimentos conduce a un aumento tanto del valor del índice de acidez como del índice de peróxidos, debido a las reacciones de hidrólisis y oxidación, respectivamente (Azócar *et al.*, 2009). De cualquier forma, los valores de índice de peróxidos obtenidos para estas muestras de aceite (entre 20 y 40 meq O₂ kg⁻¹) permiten su conservación durante un determinado periodo de tiempo, dado que los aceites no se ponen rancios mientras que el índice de peróxidos sea inferior a 40 meq O₂ kg⁻¹. De igual modo ocurre con los aceites sin usar,

cuyos índices de peróxidos no superan en ningún caso los 10 meq O₂ kg⁻¹ (Onyeike *et al.*, 2002).

Aunque el índice de peróxido no sea un parámetro especificado en la norma UNE-EN 14214:2009, se debe estudiar tanto en la materia prima como en el biodiesel, para poder asegurar un correcto funcionamiento de los motores diésel, ya que un aumento del índice de peróxidos provoca un aumento en el número de cetano del biocombustible. Esto puede reducir el tiempo de espera de ignición, pero también presenta otros efectos negativos, como la compatibilidad del biodiesel con ciertos plásticos y elastómeros de caucho natural, particularmente a elevadas temperaturas (Dunn, 2005; Bouaid *et al.*, 2007).

VI.2.1.6 Contenido en agua y materias volátiles

El contenido en agua en un aceite es un parámetro importante a tener en cuenta, ya que el agua produce la hidrólisis de los triglicéridos produciendo FFA, mono- y diglicéridos y/o glicerol libre. La presencia de agua en las muestras de aceite y grasas animales tiene efectos adversos sobre la reacción de transesterificación, ya que produce la formación de jabones durante la misma, reduciendo la eficiencia del catalizador, lo que conduce a una pérdida de materia prima para la obtención de FAMES (Kusdiana *et al.*, 2004; Demirbas, 2009).

En las reacciones de transesterificación catalizadas por NaOH, la existencia de FFA y agua da lugar a efectos negativos sobre el rendimiento de la reacción, ya que ambos afectan al consumo de catalizador y dificultan el proceso de separación de la glicerina de los FAMES, contaminando el producto final (Felizardo *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006a Georgogianni *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Dunn, 2009; Trujillo Hernández, 2009).

Los resultados obtenidos para el contenido en agua y materias volátiles de las muestras de aceite estudiadas, según el procedimiento descrito en la sección III.4.3, se muestran en la Figura VI.4.

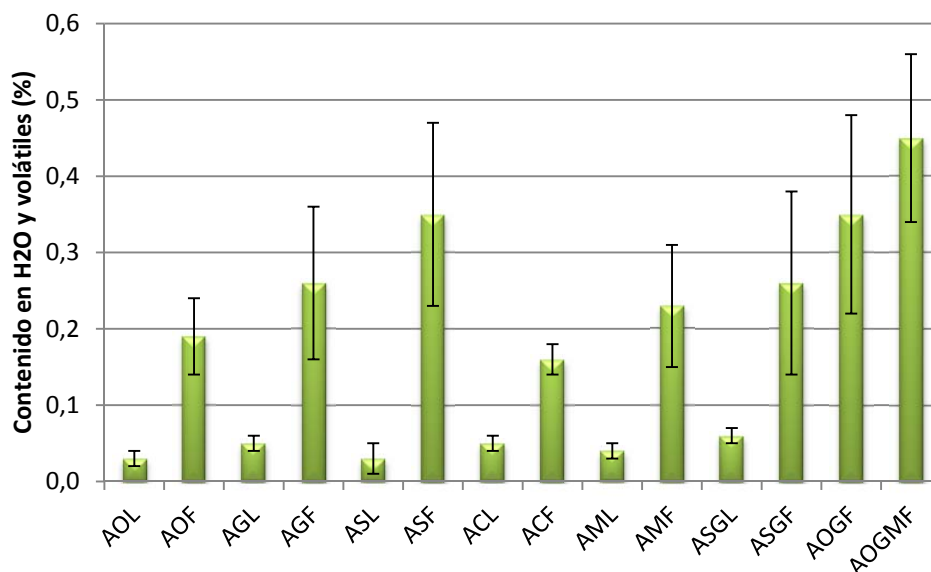


Figura VI.4.- Contenido en agua y materias volátiles, en % (media \pm desviación estándar, $n=3$), de los aceites estudiados.

Las muestras de aceite sin usar presentan valores del contenido en agua y materias volátiles comprendidos entre 0,03 y 0,06 %, mientras que las muestras de aceite de fritura presentaron valores claramente superiores, comprendidos entre 0,19 y 0,35 %. Del mismo modo que en los parámetros anteriores, se observa que las muestras de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (AOGF y AOGMF) presentan valores muy similares entre sí (0,35 y 0,45 %). Los valores se encuentran comprendidos en el intervalo obtenido para estos tipos de aceites por diferentes autores (Felizardo *et al.*, 2006; Rashid *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2009). A la vista de los resultados obtenidos, se corrobora que los procesos de fritura contribuyen a la presencia de agua en los aceites, ya que el cocinado implica un proceso de deshidratación, en el que el agua y los compuestos solubles se transfieren de los alimentos al aceite (Issariyakul *et al.*, 2008; Berrios *et al.*, 2010).

Según algunos autores (Ma *et al.*, 1999; Kusdiana *et al.*, 2004; Issariyakul *et al.*, 2008; Refaat *et al.*, 2008), el contenido en agua de las muestras de aceite debe mantenerse por debajo del 0,06 %, ya que la presencia de agua afecta más negativamente a la reacción de transesterificación que los propios FFA presentes en el aceite, pudiendo provocar incluso la hidrólisis de los FAMES formados. Otros autores (Canakci *et al.*, 1999; Cvengros *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2009) han indicado que el contenido en agua en las muestras de aceite debe ser inferior a 0,1 %, para que la reacción de transesterificación alcalina permita la obtención de elevados porcentajes de FAMES y no se vea afectada por la formación de jabones.

Los aceites sin usar presentan contenidos en agua que se encuentran dentro de los valores aceptados en la bibliografía. En cambio, para el caso de las muestras de aceite de fritura, los valores encontrados están incluso por encima del 0,1 % que es el valor máximo encontrado por algunos autores para este parámetro. Con objeto de disminuir el contenido en

agua y del mismo modo que ocurrió en la determinación del índice de acidez, las muestras de aceite de fritura se sometieron a una etapa previa de deshidratación con MgSO_4 anhidro y, posteriormente, se sometieron a filtración a vacío con objeto de eliminar cualquier materia en suspensión y restos de MgSO_4 (Felizardo *et al.*, 2006; Trujillo Hernández, 2009). En la Tabla VI.8 se muestran los valores de contenido en agua y materias volátiles de las muestras de aceite de fritura sometidas a deshidratación.

Tabla VI.8.- Contenido en agua y materias volátiles, en % (media \pm desviación estándar, $n=3$), para los aceites de fritura sometidos a un proceso de deshidratación con MgSO_4 .

Aceite	Contenido en agua y materias volátiles (%)
AOF	0,02 \pm 0,01
AGF	0,04 \pm 0,02
ASF	0,06 \pm 0,01
ACF	0,03 \pm 0,01
AMF	0,06 \pm 0,02
ASGF	0,07 \pm 0,03
AOGF	0,05 \pm 0,02
AOGMF	0,09 \pm 0,01

En ella se observa que el contenido en agua de las muestras de aceite de fritura sometidos al proceso de deshidratación ha disminuido considerablemente, hasta valores inferiores al 0,1 %, por lo que ya serían adecuadas para ser transformadas en biodiesel mediante una reacción de transesterificación catalizada por NaOH, permitiendo la obtención de elevados porcentajes de FAMEs. De esta forma, se ha conseguido que las muestras de aceite procedentes de procesos de fritura tengan las mismas características que las muestras de aceite sin usar para la obtención de biodiesel de acuerdo con Knothe (2010).

VI.2.2 Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea

Todas las muestras de aceite anteriores han sido utilizadas como materia prima en la reacción de transesterificación con metanol según el procedimiento descrito en la sección III.4.2. Se ha llevado a cabo un estudio de la propiedades físico-químicas que presentan los FAMEs obtenidos a partir de muestras de aceite, tanto sin usar como de fritura, con objeto de evaluar si cumplen con las especificaciones técnicas exigidas por la normativa vigente (UNE-EN 14214:2009+A1=2010 y Real Decreto 61/2006) para ser considerados como biocombustibles alternativos a los de origen fósil. Los ensayos necesarios se han realizado según los procedimientos descritos en la sección III.4.3.

VI.2.2.1 Densidad

La densidad del biodiesel suele ser superior a la del diésel, cuyos valores deben estar comprendidos entre 820,0 y 845,0 kg m⁻³ (UNE-EN 590:2009). En el caso del biodiesel, esta propiedad depende de su composición en ácidos grasos y su pureza, de modo que ácidos grasos con cadenas más cortas y mayor cantidad de insaturaciones, dan lugar a un biodiesel de mayor densidad.

Los resultados obtenidos para la densidad, a 15 °C, de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea a partir de diferentes tipos de aceites, mediante densímetro de inmersión, picnómetro y densímetro digital, se muestran en la Figura VI.5.

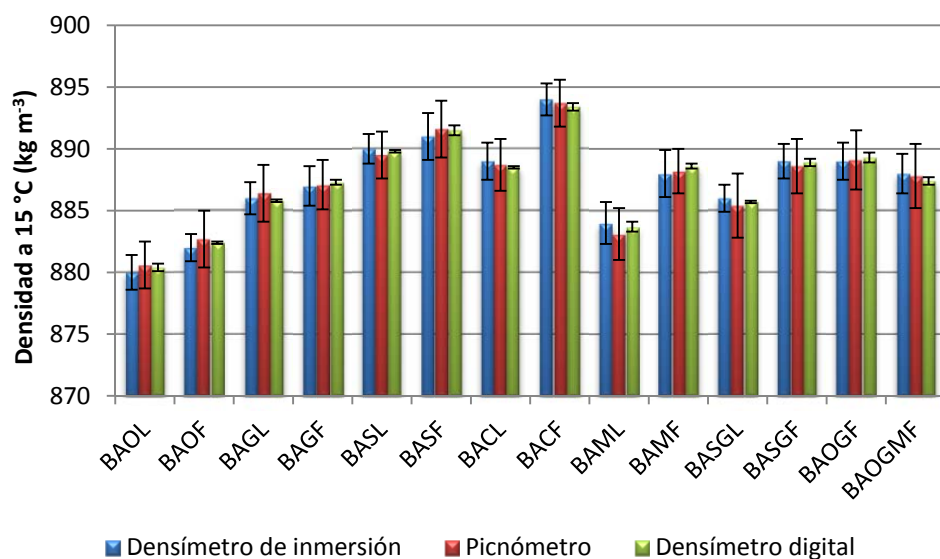


Figura VI.5.- Densidad a 15 °C, en kg m⁻³ (media ± desviación estándar, n=3), de las muestras de biodiesel estudiadas mediante los tres métodos empleados.

Las muestras de biodiesel procedentes de aceite sin usar de diferente naturaleza presentan valores de densidad comprendidos entre 880,4 y 889,8 kg m⁻³, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 882,4 y 893,4 kg m⁻³. Asimismo, se observa que las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (BAOGF y BAOGMF) presentan valores muy similares entre sí (889,3 y 887,4 kg m⁻³). Los valores obtenidos para todos los biodiesel obtenidos están comprendidos dentro del intervalo establecido por distintos autores en la bibliografía para este tipo de materias primas. (Haas, 2005; Vicente *et al.*, 2007a; Alptekin *et al.*, 2008; Issariyakul *et al.*, 2008; Lapuerta *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Ferella *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010).

De modo similar a lo ocurrido con las muestras de aceite, los resultados obtenidos mediante el densímetro de inmersión fueron, en la mayoría de los casos, ligeramente inferiores a los obtenidos mediante el picnómetro, y éstos a su vez, inferiores a los obtenidos con el densímetro digital. En este caso, las diferencias encontradas entre los diferentes

métodos empleados no son significativas. Puesto que los resultados obtenidos mediante el densímetro digital fueron los más reproducibles, se han tomado estos valores como dato de densidad.

Como se observa en la Figura VI.5, todas las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura presentan valores de densidad superiores a los correspondientes a las muestras de biodiesel procedentes de aceite sin usar, siguiendo el mismo comportamiento observado para las muestras de aceite (Figura VI.1). A la vista de las Figuras VI.1 (aceites) y VI.5 (biodiesel), se observa que los valores de densidad han disminuido notablemente con respecto a los aceites sin transesterificar, por lo que la reacción de transesterificación ha sido útil para transformar los triglicéridos en FAMES. La densidad de un biodiesel es importante, principalmente, en los sistemas de combustión en ausencia de aire, ya que ésta influye en la eficiencia de la atomización del biocombustible, contribuyendo al rendimiento de los motores, a las características de la combustión y a las emisiones de gases (Felizardo *et al.*, 2006; Alptekin *et al.*, 2008). Por tanto, la importancia de este parámetro radica en su influencia sobre el poder calorífico y el consumo específico de biocombustible.

La normativa europea establece que la densidad del biodiesel debe estar comprendida entre 860 y 900 kg m⁻³ por lo que, de acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras de biodiesel estudiadas cumplen adecuadamente con la mencionada normativa

VI.2.2.2 Viscosidad cinemática

Se podría afirmar que la viscosidad es la propiedad más importante del biodiesel, ya que afecta al funcionamiento del sistema de inyección del combustible, así como a la atomización y pulverización del biodiesel en los inyectores, especialmente a bajas temperaturas, cuando el aumento de la viscosidad afecta a la fluidez del mismo (Alptekin *et al.*, 2008). Un valor demasiado bajo de viscosidad es indicativo de la presencia de restos de metanol sin reaccionar en el biodiesel, por lo que los inyectores se tendrían que reparar con cierta frecuencia debido al desgaste de la bomba de inyección. Por otro lado, un valor demasiado elevado es indicativo de la presencia de triglicéridos que no han reaccionado y la formación de polímeros, por lo que los inyectores sufrirían una presión excesiva, que se traduciría en una mala atomización del biodiesel, originando una mala combustión y depósitos de carbón en los motores, con el consiguiente aumento de emisiones de gases (Enweremadu *et al.*, 2009; Balat *et al.*, 2010; Gumus *et al.*, 2010).

El hecho de que la viscosidad del biodiesel sea superior a la del diésel convencional, convierte al biodiesel en un excelente aditivo para mejorar la lubricidad de los motores (Tate *et al.*, 2006), por lo que es necesario alcanzar una situación de compromiso que permita facilitar los efectos lubricantes del biodiesel sin afectar al sistema de inyección.

En la Tabla VI.9 se recogen los resultados conseguidos para la viscosidad cinemática, a 40 °C, de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina a partir de diferentes tipos de aceites.

Tabla VI.9.- Viscosidad cinemática a 40 °C, en cSt (media ± desviación estándar, n=3), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Biodiesel	Viscosidad cinemática a 40 °C (cSt)
BAOL	4,07 ± 0,09
BAOF	4,46 ± 0,06
BAGL	4,22 ± 0,04
BAGF	4,45 ± 0,03
BASL	4,31 ± 0,09
BASF	4,82 ± 0,11
BACL	4,57 ± 0,08
BACF	4,70 ± 0,06
BAML	3,56 ± 0,03
BAMF	4,09 ± 0,07
BASGL	4,55 ± 0,04
BASGF	4,86 ± 0,09
BAOGF	4,92 ± 0,11
BAOGMF	5,05 ± 0,13

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite sin usar de diversa procedencia presentan valores de viscosidad cinemática comprendidos entre 3,56 y 4,57 cSt, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 4,45 y 4,86 cSt. De nuevo, las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores muy similares entre sí (4,92 y 5,05 cSt). De la misma forma, se ha observado que los valores obtenidos se encuentran comprendidos en el intervalo encontrado para estos tipos de muestras de biodiesel, por varios autores en la bibliografía (Mittelbach *et al.*, 2001; Barnwal *et al.*, 2005; Ramadhas *et al.*, 2005; Encinar *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2008; Enweremadu *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010; Porte *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010).

Como se observa en la Tabla VI.9, todas las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura de distinto origen presentan valores de viscosidad cinemática superiores a las correspondientes muestras de biodiesel procedentes de aceites sin usar, siguiendo el mismo comportamiento observado para las muestras de aceite (Tabla VI.5). En general, la viscosidad del biodiesel es ligeramente superior a la del diésel convencional, cuyo valor medio es, aproximadamente, 2,80 cSt, mientras que la viscosidad de los aceites de procedencia suele ser entre 10 y 20 veces superior a este valor.

En la Figura VI.6, se comparan las viscosidades cinemáticas de las muestras de aceites y las de las correspondientes muestras de biodiesel obtenidas a partir de ellas, en la que se observa la disminución en los valores de viscosidad comentada.

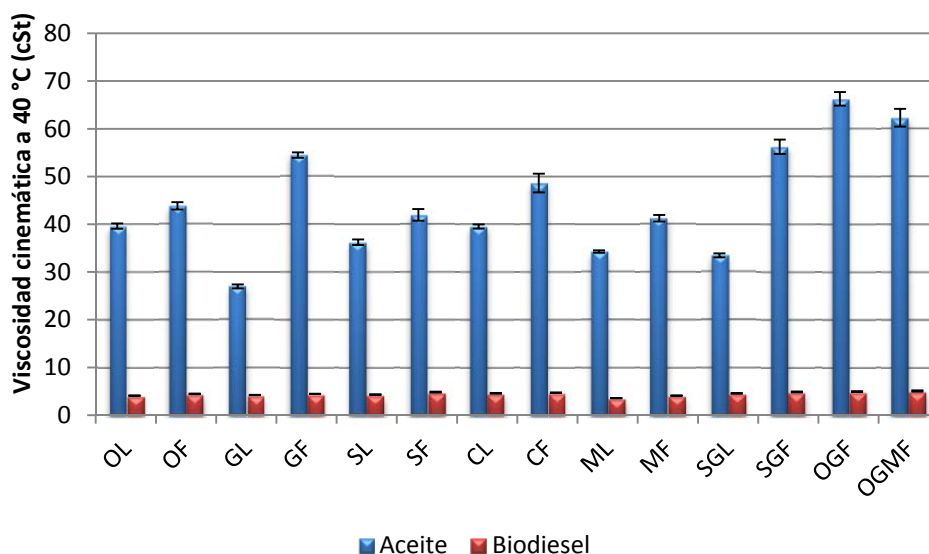


Figura VI.6.- Comparación entre las viscosidades cinemáticas de las muestras de aceite y biodiesel obtenidas.

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece que la viscosidad del biodiesel debe estar comprendida entre 3,50 y 5,00 cSt. De esta forma, se puede afirmar que las muestras de biodiesel estudiadas cumplen con lo especificado en la normativa, como se observa en la Tabla VI.9, con la excepción de la muestra BAOGMF, cuya viscosidad ($5,05 \pm 0,13$ cSt) supera ligeramente el límite máximo exigido por la normativa europea sobre biocombustibles. Este hecho puede estar asociado a un menor rendimiento en el proceso de transesterificación de esta mezcla de aceites de fritura, existiendo aceite sin reaccionar en el biodiesel obtenido. Teniendo en cuenta la normativa americana, todas las muestras de biodiesel cumplirían con las especificaciones, debido a que según la norma ASTM D6751-09, la viscosidad cinemática de los biocombustibles debe estar comprendida entre 1,6 y 6,0 cSt.

VI.2.2.3 Índice de acidez

El índice de acidez es un indicador de la estabilidad del biodiesel, y su valor aumenta con el tiempo, indicando la degradación del mismo (Tang *et al.*, 2008). Los sistemas de inyección, que operan a temperaturas elevadas, aceleran la degradación del biocombustible, aumentando así su acidez, lo que ocasiona la formación de pequeñas partículas de carbón y su posterior depósito en los filtros de combustible. Además, al aumentar la acidez, se incrementa la posibilidad de corrosión de los elementos metálicos del motor, oxidación, decapado, ataque a inyectores, etc., disminuyendo la estabilidad del biodiesel con el tiempo.

El índice de acidez de un biodiesel es indicativo de la presencia de FFA del aceite de partida que no han reaccionado durante el proceso de transesterificación, así como de otros

ácidos, como el H_3PO_4 empleado durante la etapa de lavado si esta no se realiza correctamente. Por tanto, a menor acidez del biocombustible, mayor será la eficacia de la reacción de transesterificación, de acuerdo con Predojevic (2008) y Knothe *et al.* (2009).

La Figura VI.7 recoge los resultados obtenidos para el índice de acidez de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea a partir de los diferentes tipos de aceites estudiados.

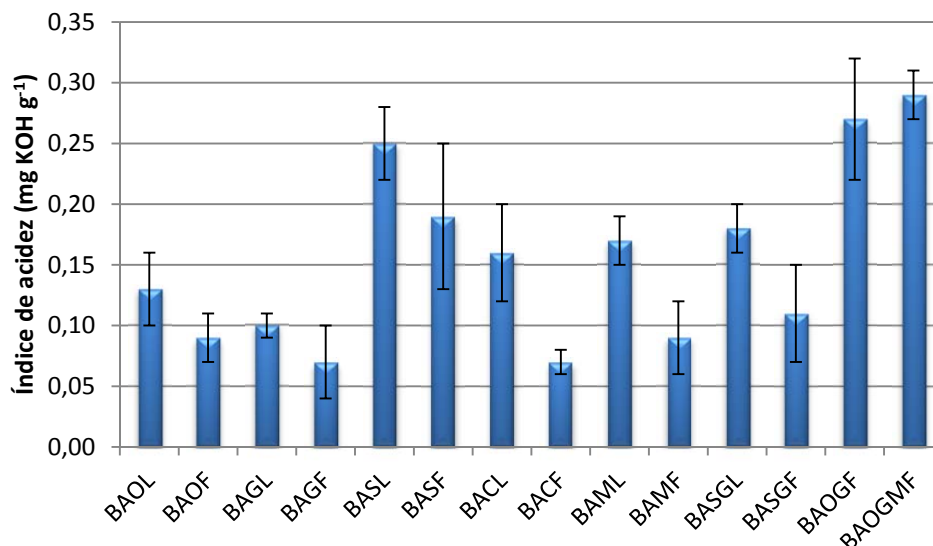


Figura VI.7.- Índice de acidez, en mg KOH g⁻¹ (media ± desviación estándar, n=3), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites sin usar presentan valores de índice de acidez comprendidos entre 0,10 y 0,25 mg KOH g⁻¹, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 0,07 y 0,19 mg KOH g⁻¹. Como en anteriores ocasiones, las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores muy similares entre sí (0,27 y 0,29 mg KOH g⁻¹) y superiores a los anteriores debido a que las materias primas de procedencia podrían haber sido muy reutilizadas. Los valores obtenidos para el índice de acidez se encuentran comprendidos dentro del intervalo definido por varios autores para muestras de biodiesel obtenidas a partir de estos aceites (Mittelbach *et al.*, 2001; Antolín *et al.*, 2002; Felizardo *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006a, 2010; Alptekin *et al.*, 2008, 2009; Predojevic, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Canakci *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Moser *et al.*, 2010; Sarin *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010).

En la Figura VI.7 se observa que, contrariamente a lo esperado, las muestras de biodiesel procedentes de aceites sin usar presentan un valor de índice de acidez superior al de los biodiesel procedentes de aceites de fritura. Esto se podría atribuir al hecho de que los aceites de fritura fueron sometidos, antes de la reacción de transesterificación, a una etapa previa de deshidratación con $MgSO_4$ anhidro y filtración a vacío, lo que ha permitido obtener muestras de biodiesel con un índice de acidez inferior, lo que evitó tener que realizar una reacción de esterificación catalizada por H_2SO_4 como paso previo a la reacción de

transesterificación catalizada por NaOH, para transformar los FFA en sus correspondientes FAMES como proponen diversos autores en la bibliografía (Nebel *et al.*, 2006; Issariyakul *et al.*, 2007, 2008; Meng *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Samios *et al.*, 2009; Berrios *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2010).

La norma europea UNE-EN 14214:2009 y la americana ASTM D6751-09 establecen que el índice de acidez de las muestras de biodiesel debe ser inferior a $0,50 \text{ mg KOH g}^{-1}$, por lo que se puede afirmar que las muestras de biodiesel estudiadas cumplen con lo establecido en las mencionadas normativas. La muestra BAOGMF es la que presenta el mayor valor de índice de acidez, aunque no llega a alcanzar el límite máximo exigido en la normativa.

Los valores de índice de acidez de las muestras de biodiesel muestran que la reacción de transesterificación ha sido realizada con éxito, puesto que se observa que el índice de acidez de las muestras de biodiesel (Figura VI.7) ha disminuido de forma drástica con respecto al obtenido para las muestras de aceite de procedencia (Figura VI.2), eliminado prácticamente la totalidad de los FFA.

VI.2.2.4 Índice de yodo

Un biodiesel con un elevado índice de yodo presenta elevadas proporciones de ácidos grasos insaturados, lo que mejora la operatividad del biodiesel a bajas temperaturas, al presentar menores puntos de fusión, pero también favorece los procesos de oxidación y polimerización, disminuyendo la estabilidad a la oxidación del biodiesel durante el periodo de almacenamiento y facilitando la formación de compuestos de mayor peso molecular en las pre-reacciones previas a la combustión. Esto facilita la formación de carbonilla en el interior de la cámara de combustión de los motores diésel, generando depósitos en el motor que obstruyen los sistemas de inyección, afectando al rendimiento de los motores que emplean estos biocombustibles.

En cambio, un biodiesel con un bajo índice de yodo mejora la estabilidad a la oxidación e impide la formación de polímeros, con lo que existe menor riesgo de formación de sólidos que puedan provocar la obstrucción de los inyectores y los pistones lo que mejora la calidad de la combustión (Vicente *et al.*, 1998, 2004; Abdullah *et al.*, 2007). Por estos motivos, es uno de los parámetros que deben estudiarse cuidadosamente en las muestras de biodiesel.

Por otro lado, Meher *et al.* (2006b) observaron que la relación molar empleada entre el aceite y el metanol durante la reacción de transesterificación no afecta al valor del índice de yodo, ya que éste sólo depende del tipo de aceite utilizado. Además, otros autores han indicado que el índice de yodo tampoco afecta al rendimiento de la reacción de transesterificación (Tomasevic *et al.*, 2003; Encinar *et al.*, 2005, 2007; Enweremadu *et al.*, 2009; Murugesan *et al.*, 2009).

En la Tabla VI.10 se recogen los resultados obtenidos para el índice de yodo de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina a partir de diferentes tipos de aceites.

Tabla VI.10.- Índice de yodo, en $\text{g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ (media \pm desviación estándar, $n=3$), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Biodiesel	Índice de yodo ($\text{g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$)
BAOL	$86,4 \pm 0,2$
BAOF	$91,4 \pm 0,4$
BAGL	128 ± 1
BAGF	$133,7 \pm 0,8$
BASL	96 ± 1
BASF	109 ± 1
BACL	97 ± 1
BACF	113 ± 1
BAML	117 ± 1
BAMF	$120,3 \pm 0,3$
BASGL	128 ± 1
BASGF	130 ± 1
BAOGF	$128,2 \pm 0,5$
BAOGMF	$135,2 \pm 0,3$

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceites sin usar presentan valores de índice de yodo comprendidos entre $86,4$ y $128 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre $91,4$ y $133,7 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ muestra. De igual forma, se observa que las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (BAOGF y BAOGMF) presentan valores similares entre sí ($128,2$ y $135,2 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ muestra). Los valores obtenidos para el índice de yodo son del mismo orden que los encontrados en la bibliografía para muestras de biodiesel obtenidas a partir de estos mismos aceites (Felizardo *et al.*, 2006; Issariyakul *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007a; Dias *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008, 2009; Brito *et al.*, 2009; Demirbas, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Gopinath *et al.*, 2009; Helwani *et al.*, 2009; Ferella *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2010).

Comparando las Tablas VI.7 (aceites) y VI.10 (biodiesel), se observa que el índice de yodo de un biodiesel obtenido a partir de aceites vegetales sin usar o de fritura es muy similar al que presentan las muestras de aceites correspondientes de acuerdo con los resultados de Bouaid *et al.* (2005, 2007), Knothe *et al.* (2007), Predojevic (2008) y Ramos *et al.* (2009), entre otros.

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece que el índice de yodo de las muestras de biodiesel debe ser como máximo de 120 g yodo por cada 100 g de muestra de

biodiesel, por lo que las muestras de biodiesel procedentes de aceite de girasol y/o soja, con un alto grado de insaturaciones, no cumplirían con este requisito. En España se exige el cumplimiento de esta norma europea mediante el Real Decreto 61/2006, con la excepción del índice de yodo, cuyo límite máximo se establece en $140 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ de muestra, con objeto de poder incluir al biodiesel procedente de estos tipos de aceites dentro de las especificaciones de calidad. Esta modificación se ha realizado con el objetivo de que estos aceites al ser más insaturados, presentan un índice de yodo superior, además de ser las materias primas más comúnmente empleadas para producir biodiesel en nuestro país.

De acuerdo con esto, las muestras de biodiesel procedentes de aceite de oliva, colza, semillas y maíz, tanto sin usar como de fritura, como era de esperar cumplen con lo especificado en la norma UNE-EN 14214:2009. Además, las muestras de biodiesel procedentes de aceite de girasol y/o soja (BAGL, BAGF, BASGL, BASGF, BAOGF y BAOGMF) presentan los valores de índice de yodo más elevados, superiores a $120 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$, aunque sin alcanzar los $140 \text{ g I}_2 [100 \text{ g}]^{-1}$ establecidos en el Real Decreto 61/2006.

VI.2.2.5 Contenido en agua

El agua presente en el biodiesel se puede presentar de dos formas: disuelta en el biocombustible o suspendida en forma de pequeñas gotas. La presencia de agua en el biodiesel se puede originar por procesos de condensación en el tanque de almacenamiento. El agua suspendida en forma de gotas origina un problema en los sistemas de inyección del combustible, ya que contribuye a la corrosión de algunas partes metálicas del motor. Además, un biodiesel con cierto contenido en agua presenta malas propiedades en frío, ya que al aproximarse a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ comienzan a formarse cristales de hielo que son el germen para la solidificación de este biocombustible (Yuan Lin *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010). También es necesario destacar que el biodiesel es ligeramente higroscópico, por lo que puede absorber pequeñas cantidades de agua de la atmósfera.

Por otro lado, durante el proceso de almacenamiento, el agua se acidifica y ataca a los depósitos donde se acumula el biodiesel, además de contribuir al crecimiento de microorganismos (hongos, bacterias, etc.), que forman lodos y sedimentos que obstruyen los filtros de combustible. Además, estos microorganismos pueden transformar el bajo contenido de azufre presente en el biocombustible en ácido sulfúrico, facilitando la corrosión de la superficie metálica de los depósitos y de las tuberías de transporte del biodiesel desde el tanque de combustible al sistema de inyección. Asimismo, un exceso de agua en el biodiesel provoca reacciones de hidrólisis de los FAMES, lo que provocaría la polimerización del biocombustible y la obstrucción de los filtros debido a la deposición de sedimentos, al mismo tiempo que se origina un incremento en su índice de acidez, como se ha comentado anteriormente (Mittelbach *et al.*, 2004; Knothe, 2005; Felizardo *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Schinas *et al.*, 2009; Bezerra de Lira *et al.*, 2010). Por lo tanto, las

condiciones de almacenamiento y la contaminación microbiana pueden afectar a la estabilidad del biodiesel (Predojevic, 2008; Demirbas, 2009; Azócar *et al.*, 2010).

En la Figura VI.8 se muestran los resultados obtenidos para el contenido en agua de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina a partir de diferentes tipos de aceites.

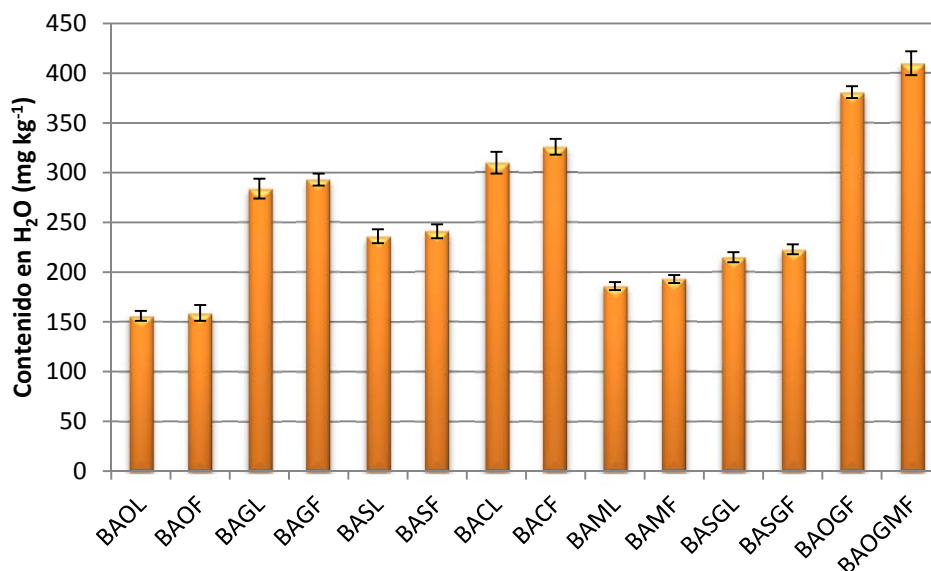


Figura VI.8.- Contenido en agua, en mg kg⁻¹ (media ± desviación estándar, n=3), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes aceites sin usar presentan valores del contenido en agua comprendidos entre 156 y 310 mg kg⁻¹, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores ligeramente superiores, comprendidos entre 159 y 326 mg kg⁻¹. En cambio, las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores similares entre sí (381 y 410 mg kg⁻¹), no existiendo diferencias significativas entre los resultados. Los valores obtenidos para el contenido en agua están de acuerdo con los encontrados en la bibliografía para muestras de biodiesel de similar naturaleza (Kusdiana *et al.*, 2004; Felizardo *et al.*, 2006; Labeckas *et al.*, 2006; Predojevic, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Dinkov *et al.*, 2009; Sarin *et al.*, 2009; Ferella *et al.*, 2010; Sabudak *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010).

Según la norma europea UNE-EN 14214:2009, el contenido de agua del biodiesel debe ser inferior a 500 mg kg⁻¹, por lo que todas las muestras de biodiesel obtenidas cumplen con la mencionada normativa.

VI.2.2.6 Volatilidad y curva de destilación

La volatilidad de un biodiesel o de un diésel es una medida de la tendencia que presenta a pasar a fase vapor bajo unas determinadas condiciones, lo que afecta al arranque y a la producción de sustancias que no han sido quemadas durante la combustión del biodiesel. La volatilidad debe encontrarse dentro de un intervalo adecuado para que la vaporización del

biodiesel sea correcta y su comportamiento en el motor sea el adecuado, de modo que a mayor volatilidad, mayor capacidad de vaporización a la salida del inyector.

La volatilidad, expresada en °C, se obtiene mediante la curva de destilación, que representa la tendencia según la cual el porcentaje de combustible evaporado varía al aumentar la temperatura. Aunque es un parámetro que no está especificado en la normativa europea, la determinación del intervalo de destilación es importante debido a que proporciona información sobre la composición del biodiesel (componentes de baja, media o alta volatilidad) y sobre el comportamiento del biocombustible durante su almacenamiento, utilización y funcionamiento global del motor (arranque, suavidad en la marcha, formación de depósitos en los tanques de almacenamiento, consumo de combustible, etc.) (Phan *et al.*, 2008).

A través de la curva de destilación también se puede evaluar la estabilidad química de los FAMES, ya que se suelen descomponer a elevadas temperaturas formando polímeros que pueden dar lugar a la formación de gomas y residuos de carbón en los inyectores o en la superficie de los pistones, provocando procesos de corrosión así como su tendencia a la formación de humo en los gases de escape (Knothe *et al.*, 2006; Bruno *et al.*, 2009). Por lo tanto, este parámetro es considerado como un indicador importante para el análisis, a largo plazo, del comportamiento del combustible en los motores diésel. Es un parámetro esencial para el biodiesel, ya que al tratarse de un combustible oxigenado, su comportamiento es diferente al combustible diésel convencional.

El valor inicial de las curvas de destilación depende de la pureza de los FAMES. En este sentido, si la temperatura a la que comienza la destilación es baja, puede ser debido a la presencia en el biodiesel de restos de metanol, sedimentos, agua, etc., por a un mal proceso de purificación del producto de la reacción de transesterificación. A medio plazo, esto conduce a la formación de depósitos carbonosos, así como a la presencia de humos negros en los gases de escape.

La curva de destilación del biodiesel es una representación gráfica de la temperatura frente al porcentaje de destilado recogido (v/v). Las curvas de destilación obtenidas para las diferentes muestras de biodiesel estudiadas se muestran en las Figuras VI.9, VI.10 y VI.11.

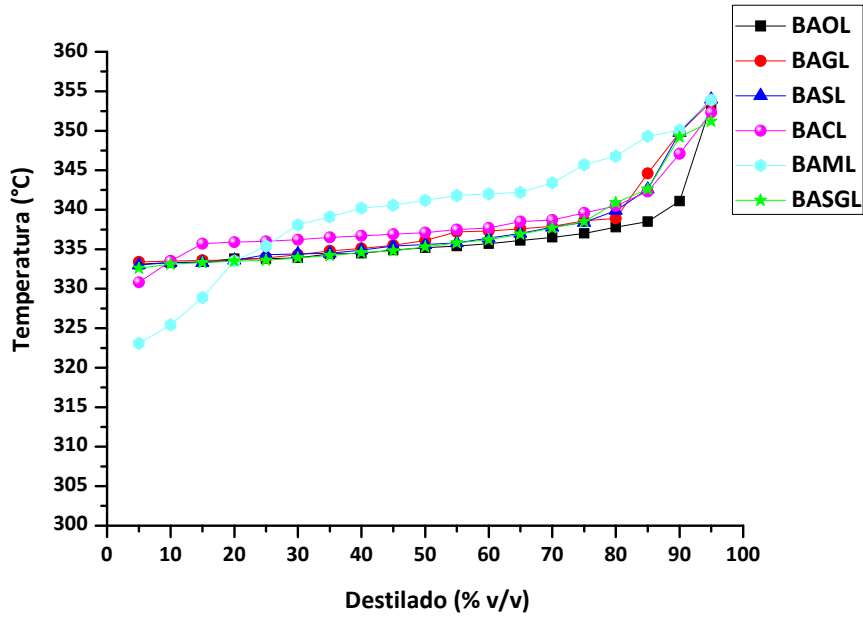


Figura VI.9.- Curvas de destilación de las muestras de biodiesel procedentes de aceites sin usar.

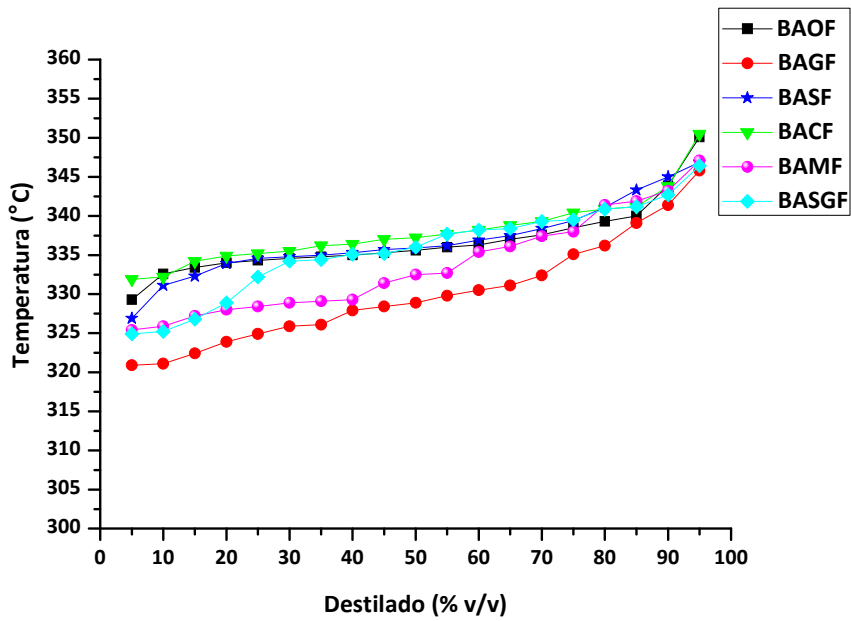


Figura VI.10.- Curvas de destilación de las muestras de biodiesel procedentes de aceites de fritura.

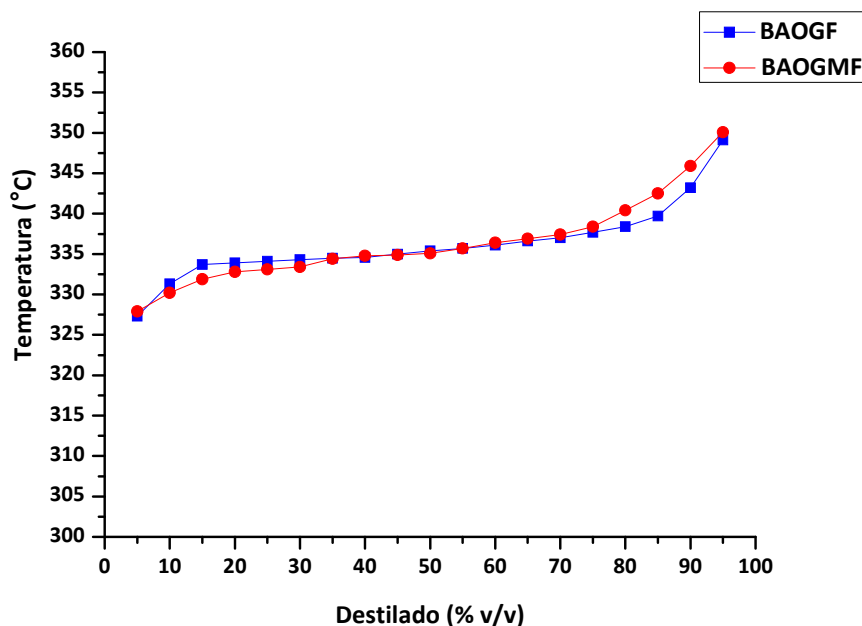


Figura VI.11.- Curvas de destilación de las muestras de biodiesel procedentes de mezclas de aceite de oliva-girasol y oliva-girasol-maíz de fritura.

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites sin usar presentan valores iniciales de la curva de destilación comprendidos entre 323,1 y 333,4 °C, estando los valores finales de la destilación comprendidos entre 351,2 y 354 °C, recogiendo a estas temperaturas el 95 % del destilado. En el caso de las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura, los valores iniciales y finales de la destilación están comprendidos entre 323,9 y 334 °C y entre 345,8 y 350,5 °C, respectivamente, recogiendo a estas temperaturas el 95 % del destilado. De igual forma, se observa que las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores iniciales de la curva de destilación comprendidos entre 332,8 y 333,9 °C, mientras que los valores finales de la destilación están comprendidos entre 349,1 y 350,1 °C, recogiendo a estas temperaturas el 95 % del destilado. Los valores obtenidos para este parámetro están de acuerdo con el intervalo definido por varios autores para muestras de biodiesel procedentes de aceites similares (Encinar *et al.*, 2005; Fernando *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2008; Demirbas, 2009; Yuan Lin *et al.*, 2009; Šimáček *et al.*, 2010; Sung Lin *et al.*, 2010).

En la norma europea UNE-EN 14214:2009, este parámetro no se encuentra especificado, mientras que la norma americana ASTM D6751-09 establece que el 95 % del destilado debe recogerse a una temperatura máxima de 360 °C, por lo que se puede afirmar que todas las muestras de biodiesel estudiadas cumplen con lo especificado en la normativa americana. Por tanto, se puede concluir que, como el final de la vaporización no ocurre a una temperatura inferior a 360 °C, los componentes menos volátiles del biodiesel se deben quemar adecuadamente en el interior de la cámara de combustión, por lo que no habría peligro de formación de carbonilla en ella, de acuerdo con Lapuerta *et al.* (2008).

VI.2.2.7 Índice de cetano

En general, el diésel de petróleo es de mejor calidad cuanto menor sea el retraso durante el encendido del combustible en el interior de la cámara de combustión, es decir, el tiempo que transcurre entre la inyección del combustible en el cilindro y la ignición del mismo (Murugesan et al., 2009). En este caso, se dice que el combustible tiene una buena facilidad de ignición cuando es comprimido en presencia de oxígeno. Para ello, es necesario que éste presente una estructura química favorable a la autoinflamación, característica que se expresa mediante el índice o número de cetano (NC), que se define como el porcentaje, en volumen, de cetano que contiene una mezcla de α -metil-naftaleno y cetano que presenta el mismo retardo a la ignición que el combustible ensayado (Lapuerta et al., 2009), ya que para evaluar la capacidad de ignición de un combustible, se compara éste con un combustible de referencia (mezcla de n-cetano (NC=100) con α -metil-naftaleno (NC=0)) en un motor CFR (Cooperative Fuel Research) normalizado.

El índice de cetano afecta a varios parámetros relacionados con el rendimiento del motor, como la estabilidad, manejabilidad, expulsión de humo, ruido, emisiones de monóxido de carbono y de óxidos de nitrógeno, al mismo tiempo que se reduce la emisión de hidrocarburos que no han sido quemados durante la combustión (Encinar et al., 2007; Predojevic, 2008; Ramos et al., 2009; Sarin et al., 2010). En general, a mayor índice de cetano, más inflamable será el combustible (Rashid et al., 2009; Smith et al., 2010).

Un índice de cetano relativamente elevado, entre 51 y 70, facilita la calidad de la combustión, lo que se refleja en la mejora de las propiedades de arranque del motor en frío, reducción del consumo de combustible, minimización de las emisiones de humo en los gases de escape, reducción del ruido y mayor durabilidad del motor (Meher et al., 2006b; Ramadhas et al., 2006; Saydut et al., 2008), aunque un combustible con un índice de cetano muy elevado (entre 80 y 90) ardería lentamente, con el consiguiente aumento de la presión y una considerable post-combustión. Por el contrario, un bajo índice de cetano, generalmente, valores inferiores a 45, origina una mayor cantidad de depósitos de carbón en el motor, así como un mayor desgaste de los pistones.

Tanto la norma UNE-EN 14214:2009 como la ASTM D6751-09 especifican los métodos para determinar los números de cetano, empleando un motor de cetano modificado (Knothe, 2006). A nivel práctico, el ICC se determina a partir de una expresión que relaciona los puntos de destilado y la densidad de las muestras de biodiesel, como se describe en la sección III.4.3. En la Figura VI.12 se muestran los resultados obtenidos para este parámetro en las muestras de biodiesel estudiadas.

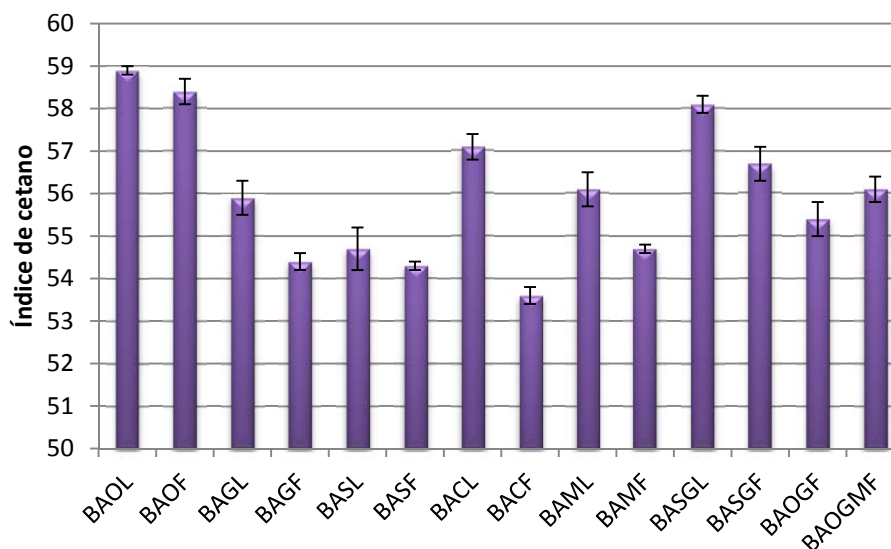


Figura VI.12.- Índice de cetano calculado (media \pm desviación estándar, $n=2$) de las muestras de biodiesel estudiadas.

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de los aceites sin usar presentan valores del índice de cetano comprendidos entre 54,7 y 58,9, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 53,6 y 58,4, y las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF valores muy similares entre sí (55,4 y 56,1). En general, los resultados obtenidos están en concordancia con los definidos por varios autores para muestras de biodiesel de similar naturaleza (Knothe, 2006; Encinar *et al.*, 2005, 2007; Agarwal, 2007; Demirbas, 2008, 2009; Park *et al.*, 2008; Saydut *et al.*, 2008; Enweremadu *et al.*, 2009; Helwani *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010; Sarin *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010). La mayor diferencia observada entre las muestras de biodiesel procedente de aceite sin usar y de fritura se encuentra para el biodiesel de aceite de colza, sin seguir ningún patrón con la materia prima o con el proceso de fritura

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece que el índice de cetano de las muestras de biodiesel debe ser superior a 51, que es el límite mínimo, mientras que la norma americana ASTM D6751-09 establece un límite mínimo, para este parámetro, de 47. Teniendo en cuenta esto se puede afirmar que todas las muestras de biodiesel obtenidas cumplen ampliamente con lo especificado en las mencionadas normativas, como se observa en la Figura VI.12.

VI.2.2.8 Punto de obstrucción de filtro en frío

El punto de obstrucción de filtro en frío (POFF), expresado en $^{\circ}\text{C}$, es un parámetro relacionado con la operatividad y rendimiento del biodiesel a bajas temperaturas. Se define como la temperatura más elevada a la que un volumen dado de combustible deja de fluir correctamente por un equipo estándar de filtración en un tiempo determinado, después de haber sido enfriado en condiciones normalizadas, como se describe en la sección III.4.3. De esta forma, se indica la temperatura por debajo de la cual los compuestos parafínicos u otros

compuestos presentes en el biodiesel pueden impedir su flujo a través de los filtros de combustible, al congelarse, provocando la obstrucción de los mismos e incluso ser tan espeso que no se pueda bombear hasta el motor (Tang *et al.*, 2008).

El POFF depende del número de insaturaciones de la materia prima con la que se elabora el biodiesel, de forma que un valor de POFF bajo puede provocar que el biodiesel no circule adecuadamente por las tuberías, afectando al rendimiento de los inyectores y las bombas. A mayor proporción de dobles enlaces, mejor será el comportamiento a bajas temperaturas de los FAMES (Enweremadu *et al.*, 2009). Los valores de este parámetro se mejoran con la incorporación de aditivos en zonas geográficas muy frías. Por lo tanto, el POFF se ve notablemente influenciado por la composición del combustible, fundamentalmente por el porcentaje de parafinas, y puede verse alterado cuando el combustible sufre calentamientos y enfriamientos o al almacenarse de forma prolongada en el tiempo. En la Tabla VI.11 se recogen los resultados obtenidos para el punto de obstrucción de filtro en frío de las muestras de biodiesel estudiadas.

Tabla VI.11.- Punto de obstrucción de filtro en frío, en °C (media ± desviación estándar, n=2), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Biodiesel	Punto de obstrucción de filtro en frío (°C)
BAOL	-10,3 ± 0,2
BAOF	-9,2 ± 0,1
BAGL	-8,6 ± 0,1
BAGF	-7,7 ± 0,2
BASL	-8,3 ± 0,3
BASF	-9,5 ± 0,1
BACL	-17,1 ± 0,3
BACF	-15,2 ± 0,2
BAML	-8,3 ± 0,3
BAMF	-8,7 ± 0,1
BASGL	-7,6 ± 0,3
BASGF	-7,9 ± 0,3
BAOGF	-9,8 ± 0,4
BAOGMF	-9,4 ± 0,3

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites sin usar presentan valores de POFF comprendidos entre -7,6 y -17,1 °C, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre -7,9 y -15,2 °C. De forma similar, se observa que las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores similares entre sí (-9,4 y -9,8 °C).

El valor de este parámetro depende del clima, de la región y de la estación del año. La norma europea UNE-EN 14214:2009 no especifica ningún valor para este parámetro, ya que

depende del clima en el que se vaya a emplear como combustible. En España, el límite máximo de POFF en verano (desde el 1 de abril hasta el 30 de septiembre) se establece en 0 °C, mientras que en invierno (desde el 1 de octubre hasta el 31 de marzo) su valor estimado en la normativa es de -10 °C. Existe una excepción para las Islas Canarias, donde se considera que el biodiesel tiene que ser considerado de calidad “Verano” durante todo el año (Landa, 2006). De esta forma, se considera un valor mínimo de POFF de 0 °C, por lo que las muestras de biodiesel estudiadas, tanto procedentes de aceite sin usar como de fritura, cumplirían con este criterio, al menos para las Islas Canarias.

A la vista de los resultados indicados en la Tabla VI.11 y según los valores máximos recogidos en la Tabla VI.3, todos los biocombustibles obtenidos pueden ser utilizados en zonas cálidas, clasificados como mínimo de grado C y, además el BAOL de grado D y el BAOL y BACF de grado E.

VI.2.2.9 Punto de inflamación o ignición

El punto de inflamación o ignición o *flash point* de un combustible líquido, expresado en °C, indica la temperatura más baja del mismo a la que la aplicación de una llama provoca la inflamación de los vapores emitidos por el combustible, con propagación de la llama sobre toda la superficie del líquido, bajo las condiciones de ensayo especificadas. Por tanto, se define como la temperatura mínima a la que los vapores producidos en el calentamiento controlado de un combustible líquido, mezclados con el oxígeno del aire, se inflaman al ponerlos en contacto con una llama piloto, de forma y tamaño especificado.

El punto de inflamación de un biodiesel permite valorar el riesgo de inflamabilidad de una sustancia y, en la actualidad, es uno de los parámetros que se contemplan en la información recogida en la ficha de seguridad de los combustibles, de forma que un valor elevado permite su empleo de forma segura. En general, el biodiesel presenta un mayor valor del punto de inflamación que los combustibles diésel, lo que proporciona una mayor seguridad desde el punto de vista del transporte, manipulación y almacenamiento, debido a su menor volatilidad y riesgo de explosiones e incendios (Ma *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003a; Felizardo *et al.*, 2006; Enweremadu *et al.*, 2009; Knothe, 2010; Saloua *et al.*, 2010).

Además, una clara disminución del punto de inflamación puede informar acerca de su posible contaminación con otros productos más ligeros. De esta forma, cuando un biodiesel presenta valores bajos del punto de inflamación puede ser debido al empleo de un exceso de metanol durante la transesterificación, por lo que este parámetro permite conocer si la reacción se ha producido en condiciones óptimas, aunque por lo general, su presencia no afecta al rendimiento del motor (Ramadhas *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2009; Hingu *et al.*, 2010). En la Tabla VI.12 se muestran los resultados obtenidos para el punto de inflamación, según el procedimiento descrito en la sección III.4.3, de las muestras de biodiesel obtenidas.

Tabla VI.12.- Punto de inflamación, en °C, (media ± desviación estándar, n=2), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Biodiesel	Punto de inflamación (°C)
BAOL	188,5 ± 0,2
BAOF	188,9 ± 0,3
BAGL	188,4 ± 0,2
BAGF	186,6 ± 0,1
BASL	180,5 ± 0,4
BASF	188,1 ± 0,1
BACL	181,2 ± 0,2
BACF	189,2 ± 0,4
BAML	188,3 ± 0,3
BAMF	190,1 ± 0,1
BASGL	184,4 ± 0,1
BASGF	185,2 ± 0,2
BAOGF	189,2 ± 0,3
BAOGMF	188,3 ± 0,3

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceites sin usar presentan valores del índice de inflamación comprendidos entre 180,5 y 188,5 °C, mientras que las procedentes de aceites de fritura presentaron valores comprendidos entre 185,2 y 190,1 °C. Se observa que las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores muy similares entre sí (189,2 y 188,3 °C). Los valores obtenidos para el índice de inflamación están en concordancia con los definidos por varios autores para muestras de biodiesel similares (Zhang *et al.*, 2003a; Encinar *et al.*, 2005, 2007; Felizardo *et al.*, 2006; Demirbas, 2008; Helwani *et al.*, 2009; Atadashi *et al.*, 2010; Sarin *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010).

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece que el punto de inflamación del biodiesel debe ser superior a 101 °C (límite mínimo), mientras que la norma americana ASTM D6751-09 especifica un valor mínimo para este parámetro de 130 °C. Por lo tanto, todos los biodiesel obtenidos presentan valores de este parámetro entorno a los 180-190 °C y, por tanto, cumplen con lo establecido en ambas normativas, como se puede apreciar en la Tabla VI.12.

VI.2.2.10 Contenido en azufre

El contenido en azufre, expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$, es un parámetro de gran interés desde el punto de vista medioambiental, ya que la presencia de azufre en los combustibles produce un aumento del material particulado, al mismo tiempo que, durante la combustión, genera la formación de óxidos de azufre (SO_x), que son liberados a la atmósfera, siendo uno de los principales causantes de la lluvia ácida.

Por otro lado, el contenido en azufre del biodiesel contribuye al desgaste del motor y a la aparición de depósitos, que varían considerablemente en importancia dependiendo, en gran medida, de las condiciones de funcionamiento del mismo. Además, la presencia de azufre contribuye a la disminución de la duración de los convertidores catalíticos presentes en los motores. Se ha comprobado que el uso de diésel con un bajo contenido en azufre presenta problemas de lubricidad en el sistema de suministro de combustible, que desaparecen al emplear biodiesel como combustible, debido a la mayor lubricidad de éste, lo cual incrementa la vida útil de los motores (Joshua, 2000). En general, como se ha indicado con anterioridad, el contenido en azufre del biodiesel es bajo, por lo que las emisiones de SO_x se reducen con respecto a las del diésel convencional. Asimismo, la emisión de partículas de azufre es inferior porque, en general, el contenido en azufre de los aceites procede de las proteínas.

En cambio, los aceites de fritura derivados de alimentos vegetales o animales pueden contener cantidades apreciables de azufre, por lo que su determinación es un factor importante. Por lo tanto, el contenido en azufre es uno de los parámetros que más diferencia al biodiesel obtenido a partir de aceites sin usar del producido a partir de aceite de fritura, siendo esta diferencia atribuida al azufre mineral que se encuentra en los alimentos ricos en proteínas y que se transfiere al aceite durante el proceso de fritura (Demirbas, 2009). La presencia de azufre en el biodiesel puede deberse, por ejemplo, a los fosfolípidos presentes en todos los aceites o a los glucosinolatos contenidos en el aceite de colza (Knothe, 2006; Rashid *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos para el contenido en azufre de las muestras de biodiesel, medidos según lo expuesto en la sección III.4.3, se recogen en la Figura VI.13.

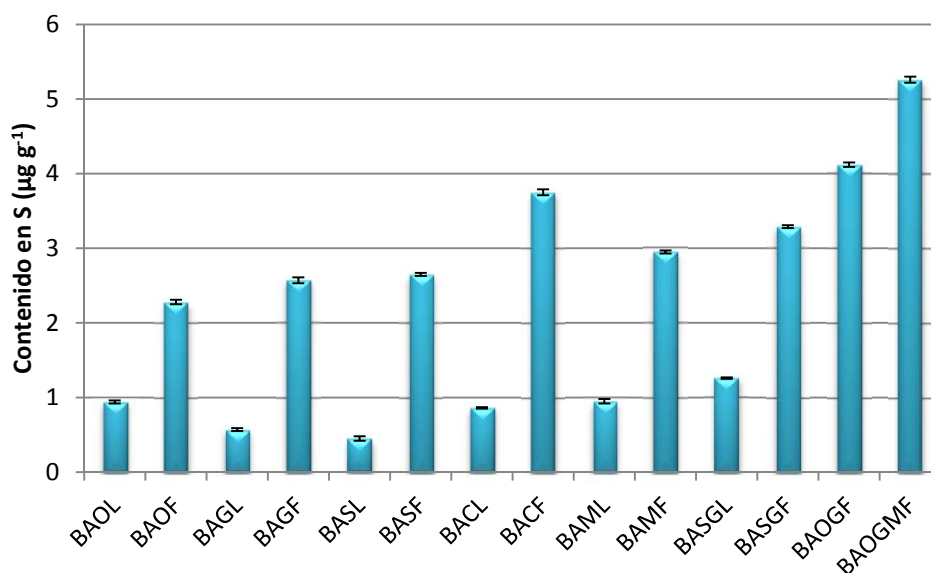


Figura VI.13.- Contenido en azufre, en $\mu\text{g g}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, $n=3$), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites sin usar presentan contenidos en azufre comprendidos entre 0,4 y 1,3 $\mu\text{g g}^{-1}$, mientras que las procedentes de aceites de fritura presentaron valores comprendidos entre 2,3 y 3,8 $\mu\text{g g}^{-1}$,

obteniéndose los mayores contenidos en azufre para las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF, con 4,1 y 5,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de S, respectivamente. Los contenidos en azufre obtenidos son similares a los encontrados por varios autores para muestras de biodiesel de naturaleza similar (Peng *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Demirbas, 2009; Lin *et al.*, 2009, 2010; Moser *et al.*, 2009, 2010). Como era de esperar, se observa que las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura presentan contenidos en azufre más elevados que las muestras de biodiesel procedentes de aceites sin usar. Se puede afirmar, por tanto, que los procesos de fritura contribuyen al aumento del contenido en azufre, debido a la absorción del azufre presente en los alimentos por parte de los aceites.

Según la normativa europea (UNE-EN 14214:2009), el contenido en azufre del biodiesel se limita a una concentración máxima de 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, mientras que la normativa americana (ASTM D5453-09) distingue entre dos tipos de azufre, el de grado S15 y el de grado S500, cuyos límites máximos son de 15 y 50 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, por lo que la normativa europea es, en la actualidad, más restrictiva que la americana, con objeto de disminuir drásticamente las emisiones de SO_x . Las muestras de biodiesel estudiadas cumplen con el límite establecido en la norma europea (Figura VI.13), ya que todas las muestras, incluidas las obtenidas a partir de aceites procedentes de procesos de fritura, presentan contenidos en azufre inferiores a 5,5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

VI.2.2.11 Contenido en cenizas sulfatadas

Los materiales que pueden formar cenizas en el interior de los motores pueden estar presentes en el biodiesel generalmente bajo tres formas:

1. Sólidos abrasivos (contaminantes inorgánicos)
2. Jabones metálicos solubles
3. Restos de catalizador que no reaccionaron y que no fueron eliminados en las etapas de lavado del biodiesel

Los contenidos elevados en cenizas sulfatadas en el biodiesel puede provocar la formación de depósitos en la cámara de combustión de los motores. Los sólidos abrasivos y los catalizadores no eliminados pueden afectar a los inyectores, filtros y bomba de inyección del combustible, generando el desgaste de los pistones y formando depósitos en el motor. Los jabones metálicos solubles tienen poco efecto sobre dicho desgaste, aunque pueden afectar a las uniones del motor y a sus empaquetaduras, contribuyendo al taponamiento de los filtros. Por lo tanto, el contenido en cenizas sulfatadas es otra de las especificaciones que debe cumplir un biodiesel para poder ser utilizado en los motores, siendo su principal causa la presencia de restos de catalizador residual en el biodiesel. Los catalizadores alcalinos pueden producir elevados niveles de cenizas incombustibles, y los catalizadores ácidos atacan a las partes metálicas del motor, por lo que deben ser siempre eliminados del biodiesel (mediante procesos de lavado con agua acidulada) cuando la reacción es incompleta (Enweremadu *et al.*,

2009). Otra causa de la formación de cenizas sulfatadas en el biodiesel es la contaminación de las muestras de aceite de partida con contaminantes inorgánicos, procedentes de los procesos de fritura de los alimentos (Fernando *et al.*, 2007).

En la Figura VI. 14 se muestran los resultados obtenidos para el contenido en cenizas sulfatadas de las muestras de biodiesel estudiadas, como se describe en la sección III.4.3.

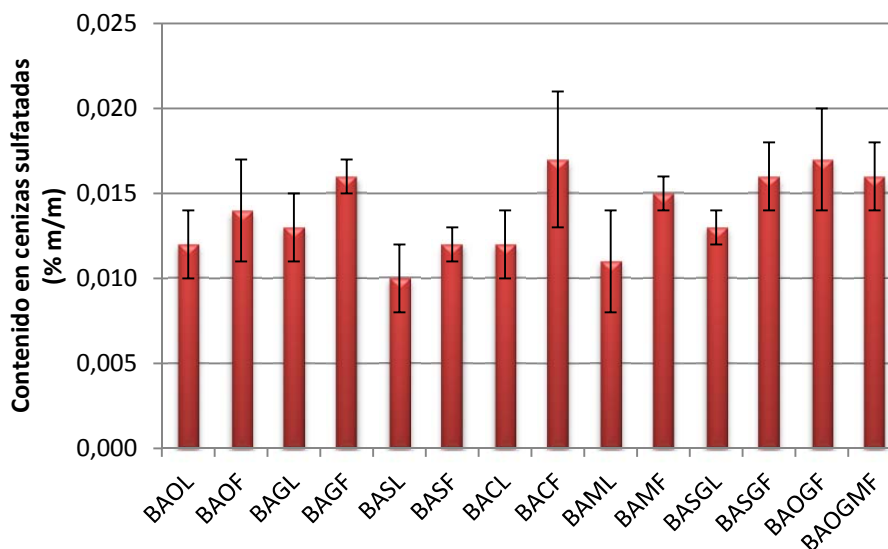


Figura VI.14.- Contenido en cenizas sulfatadas, en % (m/m) (media \pm desviación estándar, n=2), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceites sin usar presentan contenidos en cenizas sulfatadas comprendidos entre 0,010 y 0,013 % (m/m), mientras que las procedentes de aceites de fritura presentaron contenidos comprendidos entre 0,012 y 0,017 % (m/m). De igual forma, se observa que las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura que son mezclas de diferentes tipos de aceites (BAOGF y BAOGMF) presentaron valores similares entre sí (0,017 y 0,016 % (m/m)). Aunque este parámetro no ha sido muy estudiado en la bibliografía, los valores obtenidos son similares a los encontrados por algunos autores (Canakci *et al.*, 2009; Sarin *et al.*, 2009; Thanh *et al.*, 2010).

Tanto la norma europea UNE-EN 14214:2009 como la americana ASTM D6751-09 establecen un contenido máximo en cenizas sulfatadas del biodiesel de 0,02 % (m/m), por lo que se observa que todas las muestras de biodiesel estudiadas (Figura VI.14) cumplen con lo especificado en ambas normas, ya que todos los contenidos en cenizas sulfatadas encontrados son inferiores a dicho valor, aunque los procedentes de aceites de fritura son ligeramente superiores.

VI.2.2.12 Residuo carbonoso Conradson

El residuo carbonoso es el residuo completo que se obtiene después de la evaporación y pirólisis de las muestras de biodiesel, por lo que es una medida de la tendencia del biocombustible a formar depósitos de carbono, los cuales favorecen la corrosión de los

motores y pueden originar el bloqueo de los filtros y del inyector del combustible. Los dos métodos más extendidos para la determinación del residuo carbonoso son Conradson (RCC) y Ramsbotton (RCR).

El residuo carbonoso Conradson es un excelente indicador de la calidad de un biodiesel, ya que guarda una estrecha relación con el contenido en triglicéridos que no han reaccionado durante la reacción de transesterificación, así como con el contenido en FFA, jabones, polímeros, restos de catalizador y otras impurezas inorgánicas presentes en el aceite de procedencia (Monteiro *et al.*, 2008; Enweremadu *et al.*, 2009; Murugesan *et al.*, 2009), por lo que su determinación es especialmente necesaria en el biodiesel procedente de aceites vegetales de fritura (Adebanjo *et al.*, 2007). Además, este parámetro también se ve influenciado por elevadas concentraciones de FAMES poli-insaturados (Mittelbach *et al.*, 1999), siendo por tanto un indicativo de la presencia de FAMES con dos o más insaturaciones y que, por tanto, son más susceptibles a la oxidación durante el almacenaje, manipulación y posterior utilización del biodiesel.

La presencia de productos, como dímeros y trímeros, formados durante el proceso de fritura tienen un efecto negativo sobre las características de un biodiesel procedente de estos aceites (Meher *et al.*, 2006b; Adebanjo *et al.*, 2007). El residuo carbonoso provoca la corrosión de las boquillas, pistones y cámara de combustión, por lo que, con objeto de evitar el desgaste y la corrosión de las partes metálicas del motor, el biodiesel debe tener el mínimo valor posible (Phan *et al.*, 2008). El valor de RCC es más importante en el biodiesel que en el diésel, ya que los depósitos carbonosos que se forman en la combustión del biodiesel son más severos, debido a su materia prima y al proceso de producción. En la Tabla VI.13 se muestran los resultados obtenidos para el residuo carbonoso Conradson de las muestras de biodiesel estudiadas, según lo descrito en la sección III.4.3.

Tabla VI.13.- Residuo carbonoso Conradson, en % (m/m) (media \pm desviación estándar, n=2), de las muestras de biodiesel estudiadas.

Biodiesel	Residuo carbonoso Conradson (% m/m)
BAOL	0,02 \pm 0,01
BAOF	0,03 \pm 0,02
BAGL	0,01 \pm 0,02
BAGF	0,02 \pm 0,01
BASL	0,02 \pm 0,02
BASF	0,01 \pm 0,01
BACL	0,03 \pm 0,02
BACF	0,04 \pm 0,04
BAML	0,01 \pm 0,03
BAMF	0,03 \pm 0,02
BASGL	0,02 \pm 0,01
BASGF	0,03 \pm 0,01
BAOGF	0,03 \pm 0,02
BAOGMF	0,04 \pm 0,02

Las muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites sin usar presentan valores de RCC comprendidos entre 0,01 y 0,03 % (m/m), mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 0,02 y 0,04 % (m/m) y las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores similares entre sí (0,03 y 0,04 % (m/m), respectivamente). Los valores obtenidos para el RCC se encuentran comprendidos dentro del intervalo definido por varios autores para muestras de biodiesel procedentes de estos tipos de aceites (Mittelbach *et al.*, 2001, 2003; Ramadhas *et al.*, 2004; Encinar *et al.*, 2007; Fernando *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010). En la Tabla VI.13 se observa que, como era de esperar, las muestras de biodiesel procedentes de aceite de fritura presentan valores de RCC ligeramente superiores, aunque no significativos, a los de las muestras de biodiesel procedentes de aceites sin usar. Los valores de RCC obtenidos muestran la eficiencia del proceso de deshidratación con $MgSO_4$ y filtración al que han sido sometidas las muestras de aceite, puesto que se han eliminado la mayor parte de los productos que pueden provocar la presencia de mayores contenidos de residuos carbonosos, al mismo tiempo que se han eliminado muchas de las impurezas presentes en el aceite de fritura original.

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece un límite máximo para el RCC del biodiesel de 0,30 % (m/m), mientras que la normativa americana ASTM D6751-09 especifica un límite máximo de 0,05 % (m/m). Por lo tanto, todas las muestras de biodiesel estudiadas, cumplen con lo especificado en ambas normativas, incluso con la americana, que es más restrictiva, ya que todos los valores de RCC encontrados son inferiores a 0,04 % (m/m), siendo

muy inferiores a lo establecido en la norma europea y muy próximos a los permitidos por la norma americana.

VI.2.2.13 Corrosión a la tira de cobre

La corrosión a la tira de cobre es una medida de la existencia en el sistema de compuestos corrosivos o ácidos, los cuales pueden atacar al cobre o a sus aleaciones (latón, bronce). Por lo tanto, este parámetro es muy importante desde el punto de vista de la compatibilidad del combustible con los componentes metálicos del motor. Por tanto, cabe destacar que, aunque el biodiesel no cause la corrosión de las partes metálicas, el contacto prolongado con estos metales podría provocar la degradación del biocombustible, provocando la formación de depósitos en los tanques de almacenamiento.

La tendencia de una muestra de un biocombustible a provocar la corrosión de las partes metálicas del motor o tanque de almacenamiento se determina por medio de un ensayo normalizado (normas UNE-EN ISO 2160:1999 y ASTM D130-04). En el biodiesel, la corrosión puede ser inducida por ácidos o algunos componentes sulfurosos, de modo que este parámetro está relacionado con el índice de acidez, así como con el contenido en agua. En la práctica, es improbable que las muestras de biodiesel puedan dar lugar a un resultado de corrosión a la tira de cobre superiores a la Clase 1, establecido por las normas (Mittelbach *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos para la corrosión a la tira de cobre de las muestras de biodiesel estudiadas, tanto procedentes de aceite sin usar como de fritura, tras la comparación visual con la placa de cobre patrón de corrosión, mostraron que todas ellas pertenecen a la Clase 1a, es decir, a la clase en la que prácticamente no se producen procesos de corrosión, lo que está en concordancia con lo establecido por varios autores para muestras de biodiesel de naturaleza similar (Karaosmanoğlu *et al.*, 1996; Kalligeros *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007; Fontaras *et al.*, 2009; Rashid *et al.*, 2009; Canoira *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2010).

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece que el biodiesel debe pertenecer a la Clase 1, mientras que la americana ASTM D6751-09 especifica que debe pertenecer a la Clase 3 (mayor nivel de corrosión), por lo que es menos restrictiva. Por lo tanto, se puede afirmar que todas las muestras obtenidas cumplen con la normativa específica para el biodiesel.

VI.2.2.14 Índice de peróxidos y estabilidad a la oxidación

Cuando el biodiesel entra en contacto con el aire y la humedad ambiental durante su almacenamiento y distribución, puede sufrir alteraciones en sus características organolépticas y en su composición química, de forma análoga a los aceites. Es interesante que el biodiesel llegue al consumidor final con las características analíticas adecuadas, sin haber sufrido procesos de degradación. Por lo tanto, los aceites con elevado contenido de insaturaciones pueden ser modificados genéticamente para reducir el número de dobles enlaces. Un ejemplo

es el aceite de girasol con alto contenido oleico, que al presentar un menor número de insaturaciones, genera un biodiesel mucho más estable (García Camús *et al.*, 2007).

Como se ha indicado con anterioridad, la inestabilidad de un combustible se debe principalmente a la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados cuando éstos entra en contacto con el aire, lo que origina la formación de peróxidos o hidroperóxidos, que son inestables y se polimerizan y descomponen fácilmente, dando lugar a la formación de compuestos de cadena carbonada más corta como aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos grasos de menor masa molecular, o bien reaccionan con otros ácidos grasos formando dímeros y trímeros de mayor masa molecular (McCormick *et al.*, 2007), que pueden provocar la formación de partículas y gomas solubles originando problemas de obturación de los filtros del sistema de inyección del combustible, e insolubles, que pueden actuar formando depósitos en la cabeza del inyector y causando fallos en las boquillas de los inyectores.

Además, la presencia de hidropéroxidos y el aumento de la acidez, provocados por la oxidación, pueden originar la corrosión de los componentes metálicos del motor, atacar a los elastómeros (material de algunos manguitos) e inducir la polimerización de los FAMES. Por todo esto, y debido a las características químicas de estos productos, es necesario asegurar la estabilidad del biodiesel durante el periodo de almacenamiento, para evitar el deterioro que, posiblemente, conduciría a una pérdida de las propiedades que permiten su empleo en motores diésel convencionales. Por ello, resulta especialmente importante evitar las reacciones de oxidación e hidrólisis en el biodiesel (Mittelbach *et al.*, 2004).

El biodiesel es menos estable a la oxidación que el diésel, debido a que los FAMES presentan insaturaciones y oxígeno en sus moléculas, por lo que su vida útil es limitada. El grado de oxidación de los compuestos grasos depende del número de dobles enlace y de su posición en la cadena carbonada (Song *et al.*, 2006).

Los recipientes de acero o aluminio son los idóneos para el almacenamiento del biodiesel, puesto que no afectan negativamente a su estabilidad. Sin embargo, el empleo de recipientes que contengan cobre, cinc, plomo o combinaciones de estos metales, afecta de manera muy negativa a la estabilidad, ya que originan gran cantidad de sedimentos. Por consiguiente, el problema del almacenamiento se ve agravado por las condiciones del mismo, que incluyen el contacto con el aire y/o con la luz, una temperatura superior a la ambiente, y la presencia de materiales contaminantes con efecto catalítico que provocan la oxidación del biodiesel (Knothe, 2007). Con objeto de evitar lo máximo posible este fenómeno durante el tiempo de almacenamiento, es recomendable conservar el biodiesel en ausencia de aire, a una temperatura inferior a 30 °C y en recipientes de acero templado, libre de óxidos.

Los resultados obtenidos para el índice de peróxidos y la estabilidad a la oxidación de las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina a partir de diferentes tipos de aceites, medidos según lo expuesto en la sección III.4.3, se recogen en la Tabla VI.14.

Tabla VI.14.- Índice de peróxidos, en meq O₂ kg⁻¹ (media ± desviación estándar, n=3), y estabilidad a la oxidación, en horas, de las muestras de biodiesel estudiadas.

Biodiesel	Índice de peróxidos (meq O ₂ kg ⁻¹)	Estabilidad a la oxidación (h)
BAOL	9,75 ± 0,19	14,1
BAOF	25,05 ± 0,21	14,6
BAGL	5,14 ± 0,12	5,4
BAGF	22,27 ± 0,14	5,8
BASL	5,25 ± 0,11	5,1
BASF	14,58 ± 0,13	5,8
BACL	24,54 ± 0,14	6,9
BACF	34,04 ± 0,20	7,2
BAML	9,78 ± 0,12	5,3
BAMF	26,56 ± 0,17	5,9
BASGL	5,18 ± 0,14	4,9
BASGF	23,73 ± 0,25	5,7
BAOGF	33,91 ± 0,15	15,2
BAOGMF	35,41 ± 0,29	16,4

Las muestras de biodiesel procedentes de aceites sin usar presentan índices de peróxidos comprendidos entre 5,14 y 9,75 meq O₂ kg⁻¹, mientras que las procedentes de aceites de fritura presentaron valores muy superiores, comprendidos entre 14,58 y 34,04 meq O₂ kg⁻¹. Las muestras de biodiesel BAOGF y BAOGMF presentan valores muy similares entre sí (33,91 y 34,41 meq O₂ kg⁻¹), como ocurrió para los parámetros estudiados anteriormente. Los valores de índice de peróxidos obtenidos para este tipo de muestras están en concordancia con los descritos por otros autores (Tomasevic *et al.*, 2003; Cvengros *et al.*, 2004; Olivera *et al.*, 2006b; Zheng *et al.*, 2006; Bouaid *et al.*, 2009; Enweremadu *et al.*, 2009; Pinzi *et al.*, 2009; Berrios *et al.*, 2010; Cerchiara *et al.*, 2010). Como se observa en la Tabla VI.14, los valores de índice de peróxidos de las muestras de biodiesel son ligeramente superiores a los obtenidos para las muestras de aceite (Figura VI.3), ya que se puede producir la autooxidación de las muestras de aceite antes y durante la reacción de transesterificación, debido a que durante el tiempo que transcurre entre que las muestras de aceite se reciben en el laboratorio y se emplean para la obtención del biodiesel, las muestras pueden experimentar procesos de oxidación al estar en contacto con el aire. Este hecho se observa tanto para las muestras de aceite sin usar como para las procedentes de procesos de fritura.

Aunque el índice de peróxidos no está especificado en la norma UNE-EN 14214:2009, este parámetro influye en el índice de cetano (Dunn, 2005a, 2005b; Bouadid *et al.*, 2007), de forma que un aumento considerable en el valor del índice de peróxidos, provocaría un aumento en el índice de cetano, con lo que se mejorarían las condiciones de ignición del biodiesel en la cámara de combustión pero, por otro lado, se presentarían problemas con ciertos plásticos presentes en las conducciones del biocombustible, ya que los elastómeros se

degradan a elevadas temperaturas. Además, un índice de peróxidos elevado es indicativo de un alto grado de oxidación del biodiesel, lo que pone de manifiesto la relación entre ambos parámetros.

Como se aprecia en la Tabla VI.14, las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceites sin usar presentan valores de la estabilidad a la oxidación comprendidos entre 4,9 y 14,1 horas, mientras que las procedentes de aceite de fritura presentaron valores comprendidos entre 5,7 y 14,6 horas, siendo las muestras BAOGF y BAOGMF las que presentaron los valores más elevados (15,2 y 16,4 horas, respectivamente). Los valores obtenidos para la estabilidad a la oxidación están en concordancia con los encontrados por varios autores para muestras de biodiesel procedentes de aceites similares, en los que no se han empleado antioxidantes (Mittelbach *et al.*, 2001; Knothe, 2005; Polavka *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2010; Melero *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2010; Sarin *et al.*, 2010).

La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece un límite mínimo para la estabilidad a la oxidación del biodiesel de 6 horas, mientras que la norma americana ASTM D6751-09 es menos restrictiva, ya que especifica un límite mínimo de 3 horas. Por lo tanto, todas las muestras de biodiesel estudiadas cumplirían con lo especificado en la norma americana, mientras que las muestras de biodiesel BAGL, BAGF, BASL, BASF, BAML, BAMF, BASGL y BASGF, no cumplirían con la normativa europea, ya que estas muestras presentan valores del periodo de inducción inferior a las 6 horas. En estos casos, será necesario el empleo de antioxidantes, sintéticos o naturales, para la conservación del biodiesel durante la fase de almacenamiento, entre 6 y 10 meses, previa a su comercialización. No se aprecia una relación directa entre los biodiesel procedentes de aceites sin usar y los de fritura, posiblemente por haber sido sometidos a un proceso de deshidratación con $MgSO_4$.

El biodiesel obtenido a partir de aceite de oliva sin usar y de fritura o mezclas de aceite de oliva-girasol y oliva-girasol-maíz de fritura presentan los valores más elevados del periodo de inducción (entre 14 y 16 horas), muy superiores al valor mínimo exigido por la norma, por lo que presentan una mayor estabilidad a la oxidación que el resto de muestras de biodiesel estudiadas. Este hecho se debe a que estas muestras presentan elevados contenidos de ácidos grasos saturados, principalmente de ácido esteárico (C18:0). Además, es importante señalar que el aceite de oliva presenta entre un 90 y un 95 % de α -tocoferol, que es un antioxidante natural capaz de evitar la autooxidación del aceite de oliva (Escuderos *et al.*, 2009) El resto de muestras de biodiesel estudiadas presentan mayores contenidos de ácidos grasos insaturados, lo que hace que su estabilidad a la oxidación sea inferior. Los aceites que se han empleado para la obtención de estas muestras de biodiesel también presentan α -tocoferol, aunque en menor proporción, por lo que su presencia no contribuye significativamente en la estabilidad a la oxidación del biodiesel.

VI.3 Conclusiones

Del estudio realizado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

- Un tratamiento de deshidratación con $MgSO_4$ seguido de la filtración del aceite permite disminuir el índice de acidez de estos aceites y el contenido en agua, permitiendo la utilización de catálisis homogénea alcalina en la reacción de transesterificación dando lugar a biocombustibles con bajos contenidos en ácidos grasos.

- Para todos los biodiesel obtenidos se cumplen los límites establecidos en la norma europea UNE-EN 14214:2009 de los parámetros de calidad, excepto en la estabilidad oxidativa para alguna de las muestras de biodiesel obtenidas. Este parámetro es un valor a largo plazo y se ve afectado principalmente por el almacenamiento del biodiesel. Por lo tanto, se hace necesario el empleo de agentes antioxidantes para evitar la oxidación del biodiesel a medida que transcurre el tiempo desde su obtención.

- El biodiesel obtenido a partir de aceites de fritura verifica las normas anteriormente mencionadas, por lo que se consigue eliminar un residuo altamente contaminante para el medio ambiente a la vez que se transforma en un biocombustible útil, alternativo al diésel de petróleo que puede ser empleado en los motores de combustión, según las especificaciones recogidas en la normativa europea

- El biodiesel presenta menores contenidos de azufre y mayores valores del índice de cetano que los combustibles diésel convencionales procedentes del petróleo, por lo que el empleo de biodiesel permitiría reducir las emisiones de óxidos de azufre y mejoraría las propiedades de ignición en los motores de combustión.

- Los FAMEs obtenidos a partir de distintos tipos de aceites vegetales sin usar y procedentes de fritura, mediante el método de producción optimizado en la presente Tesis Doctoral, han demostrado ser válidos para su utilización como combustibles en motores diésel, ya que han verificado la mayoría de las especificaciones de la normativa europea.

CAPÍTULO VII



**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL
TIEMPO Y LA TEMPERATURA EN
LA ESTABILIDAD DEL BIODIESEL
MEDIANTE LA DETERMINACIÓN
DEL CONTENIDO EN FAMES POR
GC-FID.**

EMPLEO DE ANTIOXIDANTES

La calidad del biodiesel puede verse afectada por las condiciones de almacenamiento, las cuales pueden alterar considerablemente la composición de FAMES en el tiempo. Por lo tanto, una vez optimizado el método de obtención del biodiesel mediante catálisis homogénea alcalina a partir de aceites vegetales, tanto sin usar como procedentes de procesos de fritura, y una vez puesto a punto el método cromatográfico mediante GC-FID para la identificación y cuantificación de los FAMES objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se hace necesario evaluar la estabilidad de la concentración de los mismos con el tiempo. Para ello, se estudió la variación del porcentaje de FAMES en muestras de biodiesel conservadas a temperatura ambiente y a +4 °C, durante un periodo de seis meses. Asimismo, se evaluó el empleo de varios antioxidantes sintéticos con objeto de estudiar la estabilidad y conservación de las muestras de biodiesel, estableciendo el contenido en FAMES en dichas muestras, durante tres y seis meses de almacenamiento.

VII.1 Antecedentes

Aunque el biodiesel es un biocombustible compatible con el medio ambiente, presenta una serie de limitaciones para su comercialización. Su principal problema como combustible alternativo al diésel convencional es el periodo de tiempo que transcurre desde su producción y almacenamiento hasta la distribución al consumidor final, ya que durante estas etapas el biodiesel puede sufrir una degradación oxidativa con el tiempo debido, principalmente, a la exposición a elevadas temperaturas, al oxígeno del aire o a la presencia de materiales extraños, como metales, que originan un efecto catalítico sobre la oxidación, pudiendo afectar a la calidad final del producto (Knothe, 2007; Monteiro *et al.*, 2008; Sarin *et al.*, 2009).

El aceite vegetal utilizado como materia prima para la producción de biodiesel, suele contener antioxidantes de origen natural, como el α -tocoferol, pero durante la etapa de secado del biodiesel estos antioxidantes naturales son eliminados por efecto de la elevada temperatura a la que se somete el producto de la reacción. De esta forma, la estabilidad a la oxidación del biodiesel disminuye considerablemente con respecto a la de las muestras de aceite (Sharma *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2010). De hecho, la resistencia a la degradación oxidativa durante el periodo de almacenamiento de los biocombustibles es una de las premisas esenciales a tener en cuenta para el buen desarrollo y viabilidad futura del empleo de los combustibles alternativos al diésel de petróleo (Bouaid *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2008).

Por este motivo, la estabilidad a la oxidación del biodiesel ha sido una de las cuestiones ampliamente estudiadas en los últimos años, como se pone de manifiesto en el elevado número de artículos publicados relacionados con el tema (Dunn, 2002, 2005a, 2005b; Mittelbach *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2006; Bouaid *et al.*, 2007; Knothe, 2007, 2010; McCormick *et al.*, 2007; Dinkov *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2009; Barnes *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2010; Karavalakis *et al.*, 2010, 2011; Papadopoulos *et al.*, 2010; Ryu, 2010; Sarin *et al.*, 2010; Dantas *et al.*, 2011; Kivevele *et al.*, 2011; Meira *et al.*, 2011).

La oxidación de un combustible suele venir acompañada por la formación de gomas solubles, que pueden originar problemas de colmatación de los filtros del motor, así como de gomas insolubles, que pueden actuar formando depósitos carbonosos en la punta del inyector, provocando fallos en sus boquillas (Mittelbach *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008).

Además de la degradación oxidativa mencionada, el biodiesel también es susceptible de sufrir una degradación hidrolítica, debida a la presencia de agua en su composición. Asimismo la presencia en el biodiesel de sustancias tales como mono y diglicéridos, que son productos intermedios de la reacción de transesterificación, o de la glicerina, que es un producto final de la misma, puede provocar la formación de emulsiones con el agua presente en el biodiesel, dispersándose en forma de pequeñas gotas y provocando la oxidación del mismo (Knothe, 2005).

Por otro lado, el biodiesel también puede sufrir procesos de autooxidación debido a la presencia de insaturaciones en las cadenas de muchos de sus componentes grasos. Los dobles enlaces son propensos a sufrir reacciones de polimerización, las cuales dan lugar a productos de elevado peso molecular, con el consiguiente aumento de la viscosidad. La velocidad de oxidación del biodiesel, principalmente de los FAMES insaturados, depende del número y posición de los dobles enlaces en la cadena carbonílica (Dunn, 2005a). La posición de los CH₂ alílicos en las cadenas de los FAMES lo hacen susceptibles de oxidarse, mientras que las posiciones de los CH₂ bis-alílicos en los FAMES poli-insaturados, tales como metil linoleato (dobles enlaces en los carbonos C9 y C12, dando una posición bis-alílica en C11) y el metil linolenato (dobles enlaces en los carbonos C9, C12 y C15, dando dos posiciones bis-alílicas en C11 y C14), son más propensos a la autooxidación que las posiciones alílicas (Knothe, 2005, 2007; Park *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009; Karavalakis *et al.*, 2010).

Este hecho es un factor muy importante a tener en cuenta, ya que la gran mayoría del biodiesel producido en la presente Tesis Doctoral contiene cantidades significativas de FAMES procedentes de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico, que presentan una gran influencia sobre la estabilidad a la oxidación de los biocombustibles por la presencia de dobles enlaces. La velocidad relativa para la oxidación de los FAMES C18 es: linolenato > linoleato >> oleato, debido a que las cadenas de los ácidos grasos di- y tri-insaturadas contienen las posiciones más reactivas para la iniciación de la reacción de autooxidación del biodiesel (McCormick *et al.*, 2007).

El biodiesel producido a partir de aceites vegetales, tanto sin usar como de fritura, es más fácilmente oxidable que los combustibles derivados del petróleo, siempre y cuando el primero no sea tratado con antioxidantes. Existen diferentes formas de prevenir la oxidación o, al menos, frenar o inhibir la cinética de la reacción, como prevenir el contacto de la materia grasa con el aire u otros oxidantes o evitar la exposición del biodiesel a la acción directa de la luz o a elevadas temperaturas. Estas soluciones no son siempre viables, por lo que una alternativa interesante para una mejor conservación del biodiesel consiste en el empleo de antioxidantes, ya que pueden alargar el período de inducción, hasta que el antioxidante añadido se agote. Por lo tanto, la adición de un antioxidante puede incrementar la estabilidad del biodiesel, pero su degradación continua lentamente según transcurren los meses de almacenamiento (Dunn, 2005a).

En general, los antioxidantes sintéticos utilizados tienen diferentes efectos sobre el periodo de inducción del biodiesel (que es una medida de su estabilidad a la oxidación), dependiendo de la materia prima empleada, pero no afectan a propiedades tan importantes como la viscosidad, punto de obstrucción del filtro en frío, densidad, punto de inflamación, índice de cetano, etc. (Knothe, 2007; Dunn, 2008; Ramos *et al.*, 2009; Atadashi *et al.*, 2010; Karavalakis *et al.*, 2010). Estos parámetros se pueden ver alterados durante el periodo de almacenamiento debido a procesos de degradación del biodiesel en ausencia de antioxidantes, pero su modificación no puede ser atribuida a su presencia. Por otra parte, algunos autores

han señalado que la adición de antioxidantes a los biocombustibles permite reducir las emisiones a la atmósfera de óxidos de nitrógeno, por lo que su presencia contribuiría a disminuir la emisión de estos gases tan nocivos para el medio ambiente. En este sentido, según McCormick *et al.* (2003), el empleo de tert-butil hidroquinona (TBHQ) permite reducir las emisiones de NO_x observadas cuando se utiliza un biodiesel estabilizado con este antioxidante mientras que, según Hess *et al.* (2005), el 3-tert-butil-4-hidroxianisol (BHA) es el antioxidante más eficiente en una selección de muestras de biodiesel a las que se les añadieron diferentes tipos de antioxidantes sintéticos, con objeto de reducir las emisiones de NO_x durante la combustión del biodiesel en los motores diésel.

Diversos tipos de antioxidantes han sido ampliamente estudiados y utilizados por varios autores, empleando diferentes técnicas de análisis (Dunn, 2002, 2005a, 2009; Biostab Project, 2003; Mittelbach *et al.*, 2003, 2004; Liang *et al.*, 2006; Domingos *et al.*, 2007; Knothe, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2010; Ryu, 2010). Por ejemplo, la actividad antioxidante, en términos de incrementos de la temperatura de inicio de la oxidación, se ha determinado por calorimetría de barrido a presión diferencial no isotérmica (P-DSC) (Dunn, 2005a; Freire *et al.*, 2009), por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Fernández *et al.*, 2010; García-Pérez *et al.*, 2010) o mediante análisis termogravimétrico (TGA) (Jain *et al.*, 2010). Otros autores han utilizado la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) y medio (MIR), junto con la calibración multivariante, para monitorizar la estabilidad del biodiesel (Bezerra de Lira *et al.*, 2010).

Ryu (2010) estudió la estabilidad a la oxidación de los biocombustibles y concluyó que ésta depende del tipo y cantidad de antioxidante empleado. En este estudio, la eficacia de los antioxidantes estudiados sobre el biodiesel seguía el siguiente orden: TBHQ (tert-butil hidroquinona) > PG (propil galato) > BHA (3-tert-butil-4-hidroxianisol) > BHT (3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) > α -tocoferol. El TBHQ es el antioxidante que ofrece mejores propiedades para la estabilidad a la oxidación de todas las muestras de biodiesel estudiadas. Asimismo, observó que los antioxidantes presentan pocos efectos sobre las emisiones de los gases de escape de un motor diésel cuando se utiliza biodiesel como combustible.

Dunn (2005a) evaluó la eficacia de cinco antioxidantes (TBHQ, BHA, BHT, PG y α -tocoferol) sobre FAMEs producidos a partir de aceite de soja y encontró que el periodo de conservación de las muestras de biodiesel aumenta con la concentración de antioxidante. El antioxidante más efectivo frente a la conservación del biodiesel fue el TBHQ, mientras que el PG, el BHA y el BHT fueron menos efectivos, y el α -tocoferol fue el menos eficaz, incluso a concentraciones de hasta 5.000 mg L⁻¹. Dunn (2002) también estudió el efecto de los antioxidantes en la estabilidad del biodiesel producido a partir del mismo tipo de aceite y, en este caso, recomendó el uso de BHA o TBHQ, a concentraciones de hasta 3.000 mg L⁻¹, y de BHT, a concentraciones relativamente bajas (210 mg L⁻¹), para evitar la autooxidación del biodiesel durante el periodo de almacenamiento. El PG mostró problemas de compatibilidad

con el biodiesel, ya que este antioxidante es relativamente poco soluble en las muestras de biodiesel procedentes de aceite de soja.

Mittelbach *et al.* (2003) estudiaron la influencia de diferentes antioxidantes sintéticos (BHT, PG, TBHQ y BHA) en la estabilidad a la oxidación de muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de colza, girasol, fritura y sebo de vacuno. Concluyeron que la utilización de estos antioxidantes permite un incremento en el periodo de inducción, aunque el empleo de PG, TBHQ y BHA como conservante de los FAMES procedentes de aceite de colza y de fritura presentaron una mejora significativa en la estabilidad a la oxidación, mientras que el empleo de BHT no fue eficaz para el almacenamiento de las muestras de biodiesel, ya que su periodo de inducción disminuyó en relación a los otros tres antioxidantes mencionados.

Por lo tanto, el TBHQ parece ser el antioxidante más eficaz entre los aditivos utilizados habitualmente como inhibidores de la oxidación del biodiesel, lo que pone de manifiesto que los procesos primarios y secundarios de oxidación se ven impedidos al utilizar esta sustancia como conservante. El hecho de que los productos de oxidación inmediata del TBHQ también presenten propiedades antioxidantes, a diferencia de otros antioxidantes sintéticos de uso común en el campo de los biocombustibles, podría explicar su mayor eficacia. Por otro lado, es bien conocido que el BHT es uno de los mejores antioxidantes fenólicos para la conservación de los hidrocarburos derivados del petróleo utilizados como combustibles y lubricantes, mientras que también se ha comprobado que es uno de los antioxidantes sintéticos menos eficaces en aceites y FAMES (Gordon *et al.*, 1994; BIOSTAB Project, 2003; Dunn, 2005a).

Es necesario tener en cuenta que la oxidación del biodiesel depende del tipo de materia prima utilizada para su producción, por lo que no todos los antioxidantes pueden presentar las mismas propiedades para la conservación del biodiesel obtenido a partir de diferentes tipos de aceites (Ryu, 2010). Por lo tanto, el estudio de la composición de los FAMES es uno de los parámetros necesarios que debe establecerse para validar la calidad del biocombustible obtenido, tanto con antioxidantes como sin ellos, por lo que la estabilidad a la oxidación de un biodiesel se podría evaluar a través del estudio de la variación del contenido en FAMES con el tiempo.

VII.2 Estudio de la influencia del tiempo y la temperatura en la variación del contenido en FAMES del biodiesel

Inicialmente, se evaluó la variación con el tiempo del contenido en FAMES en las muestras de biodiesel obtenidas a partir de muestras de aceite, tanto sin usar como de fritura, según el procedimiento descrito en el Capítulo III, sección III.4.2. Para realizar este estudio se seleccionaron cuatro muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de girasol sin usar y de fritura (BAGL y BAGF) y aceite de semillas sin usar y de fritura (BASL y BASF). El desarrollo del estudio se llevó a cabo durante un periodo de seis meses, almacenando las muestras de biodiesel a dos temperaturas: ambiente y +4 °C (nevera). Las muestras de biodiesel fueron

almacenadas en frascos de vidrio color topacio, para evitar el contacto directo con la radiación luminosa, y almacenadas en un lugar en ausencia de luz, ya que se sabe que las muestras de biodiesel que están en contacto con la luz se degradan más rápidamente que las que se conservan en ausencia de la misma (Bouaid *et al.*, 2007). Las muestras almacenadas se analizaron cada treinta días mediante GC-FID para determinar el contenido de FAMES, según el método cromatográfico optimizado descrito en el Capítulo III, sección III.4.1.

La Tabla VII.1 recoge los contenidos iniciales de FAMES de los biodiesel estudiados el mismo día en el que fueron preparados mediante la reacción de transesterificación.

Tabla VII.1.- Composición inicial, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de girasol y de semillas, sin usar y de fritura.

FAMES	% FAMES			
	BAGL	BAGF	BASL	BASF
(C16:0)	6,70 \pm 0,06	4,40 \pm 0,09	5,10 \pm 0,04	9,70 \pm 0,01
(C18:0)	1,30 \pm 0,04	1,48 \pm 0,06	2,10 \pm 0,03	1,60 \pm 0,05
(C18:1)	25,2 \pm 1,3	30,5 \pm 1,3	30,2 \pm 1,4	29,9 \pm 0,2
(C18:2)	64,1 \pm 1,2	66,5 \pm 1,1	62,1 \pm 1,2	56,9 \pm 0,3
(C20:1)	2,2 \pm 0,4	1,10 \pm 0,01	-	-
(C22:0)	-	-	0,40 \pm 0,01	1,20 \pm 0,04
% Total	99,5 \pm 1,8	99,7 \pm 1,7	99,9 \pm 1,6	99,3 \pm 0,4

Como puede apreciarse en la Tabla VII.1, todas las muestras de biodiesel estudiadas cumplen, inicialmente, con la normativa europea (UNE-EN 14103:2003), ya que superan el valor mínimo establecido por esta norma consistente en una concentración mínima de FAMES del 96,5 %.

Posteriormente, los contenidos en FAMES fueron determinados cada 30 días, en las muestras de biodiesel almacenadas en frascos color topacio a temperatura ambiente y +4 °C. Los resultados obtenidos para las muestras de biodiesel procedentes de aceite de girasol sin usar y de fritura, conservadas a temperatura ambiente y a +4 °C, se muestran en las Figuras VII.1 y VII.2, respectivamente.

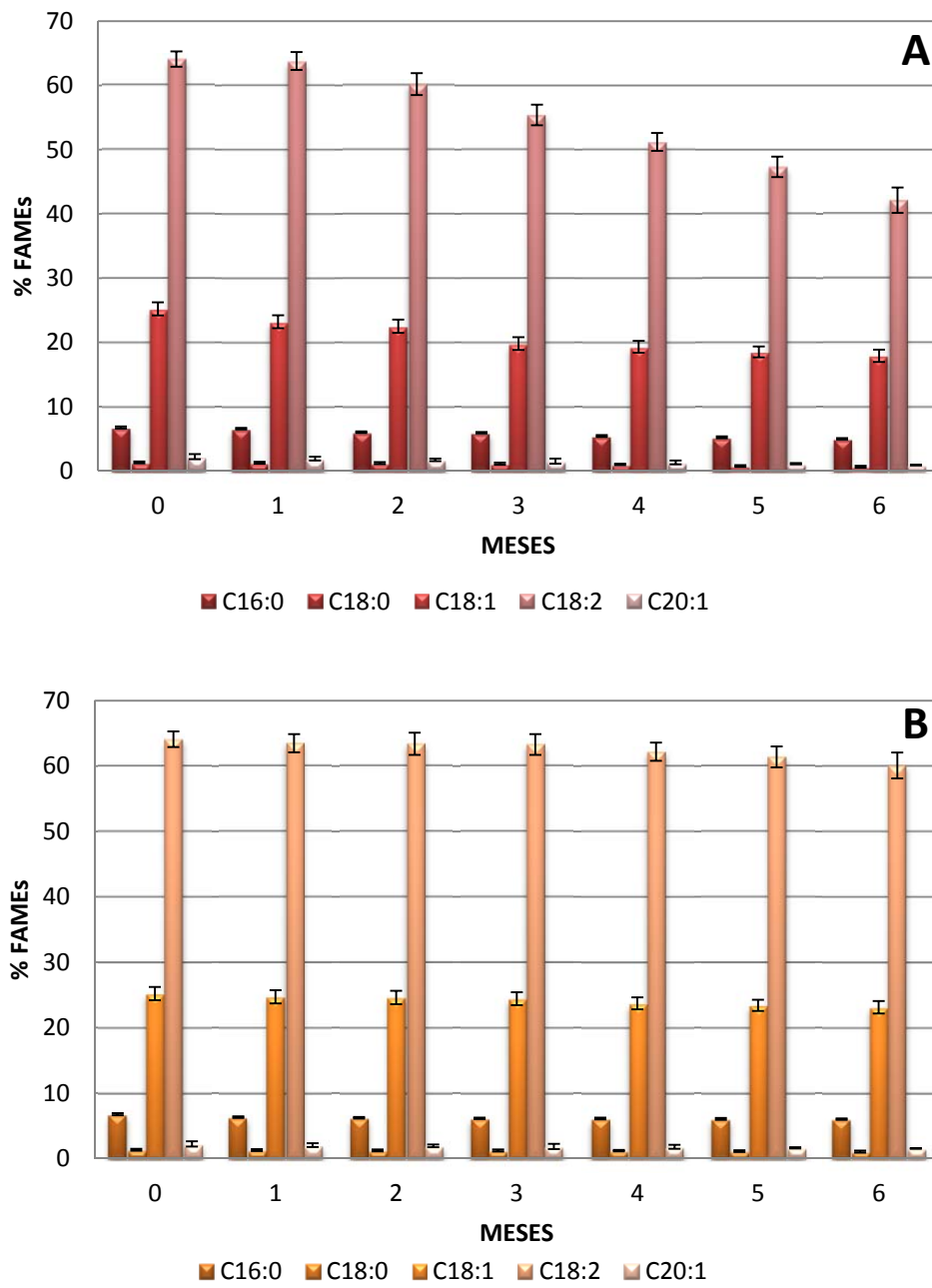


Figura VII.1.- Variación del contenido en FAMES con el tiempo para la muestra BAGL almacenada a temperatura ambiente (A) y a +4°C (B).

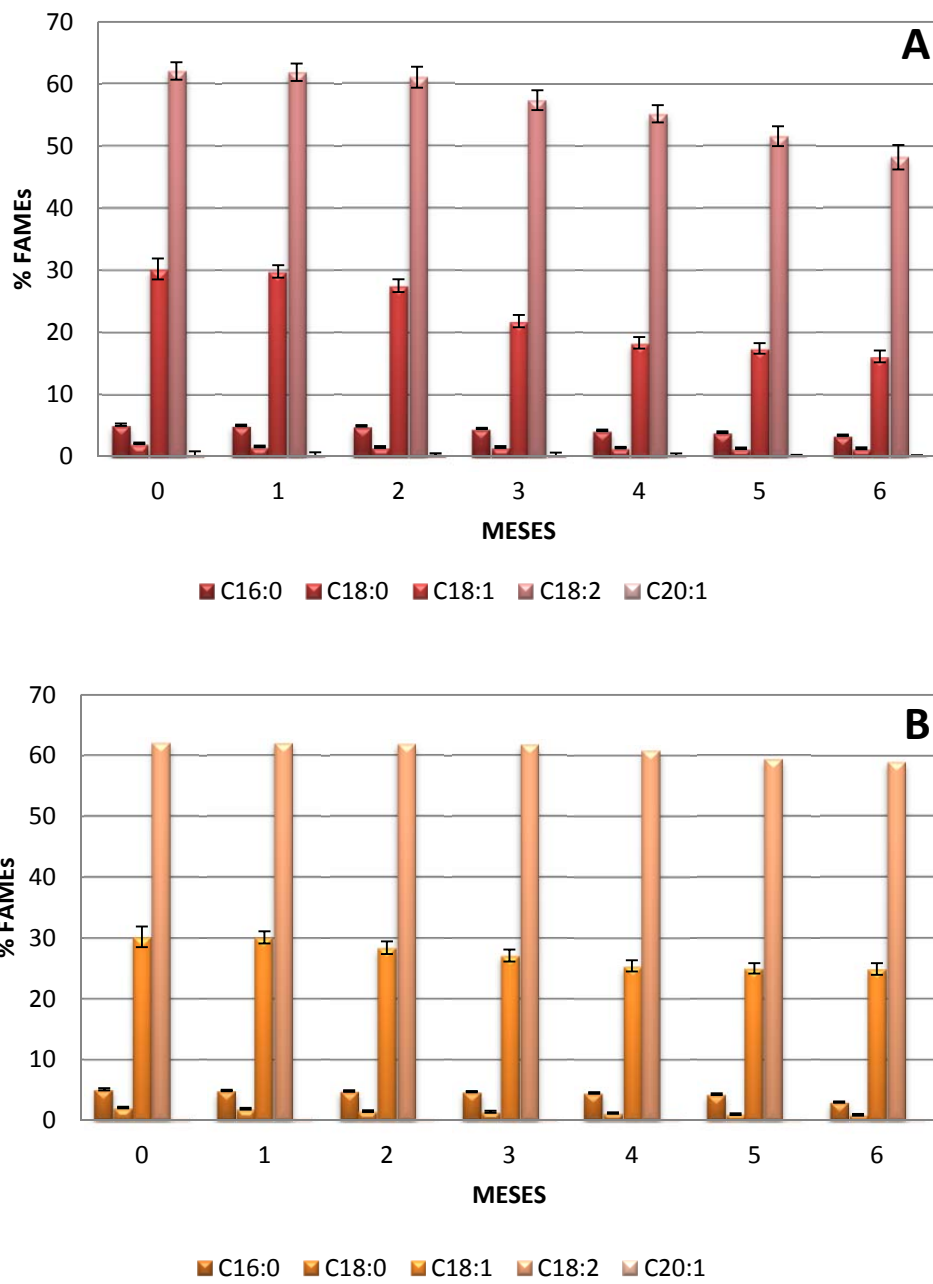


Figura VII.2.- Variación del contenido en FAMES con el tiempo para la muestra BAGF almacenada a temperatura ambiente (A) y a +4°C (B).

Como puede observarse en las mencionadas figuras, tanto en las muestras de biodiesel procedentes de aceite de girasol sin usar (Figura VII.1.A) como de fritura (Figura VII.2.A) almacenadas a temperatura ambiente, se aprecia una disminución del contenido en FAMES a partir del segundo mes de almacenamiento, lo que pone de manifiesto la influencia negativa del almacenamiento sobre la calidad del biodiesel durante el periodo de tiempo considerado. Sin embargo, este efecto no se aprecia, al menos de forma significativa, a la temperatura de conservación de +4 °C, ya que la concentración total de FAMES permanece aproximadamente estable en el periodo de tiempo estudiado, como se puede observar en las Figuras VII.1.B y VII.2.B, lo que muestra la influencia de la temperatura de almacenamiento.

Se observa que, hasta el segundo mes de almacenamiento, la concentración total de FAMES de las muestras de BAGL y BAGF almacenadas a temperatura ambiente fueron superiores al 96,5 %, valor mínimo establecido por la norma, y a partir de este momento para ambos biocombustibles, el contenido en FAMES va disminuyendo paulatinamente durante el periodo de almacenamiento, desde el segundo hasta el sexto mes, donde la concentración total de FAMES es de 66,5 % y 69,2 % para el BAGL y el BAGF, respectivamente. Por lo tanto, las muestras de biodiesel almacenadas a temperatura ambiente cumplirían con lo especificado en la norma UNE-EN 14103:2003 sólo hasta el segundo mes de almacenamiento.

En relación con las muestras conservadas a una temperatura de +4 °C, los contenidos totales de FAMES obtenidos, para el tercer mes de almacenamiento, fueron superiores al 96,5 % para ambos tipos de muestras, disminuyendo estos contenidos hasta el 91,7 % y 89,8 %, para el BAGL y el BAGF respectivamente, en el sexto mes de conservación. Por lo tanto, se puede concluir que las muestras de biodiesel son más estables a +4 °C que a temperatura ambiente, ya que el almacenamiento a +4 °C permitiría la conservación de las muestras durante un mes más que a temperatura ambiente, si se tiene en cuenta la normativa europea.

En la Figura VII.3 se muestran los cromatogramas inicial y a los seis meses de almacenamiento correspondientes a la muestra de BAGL a una temperatura de +4 °C.

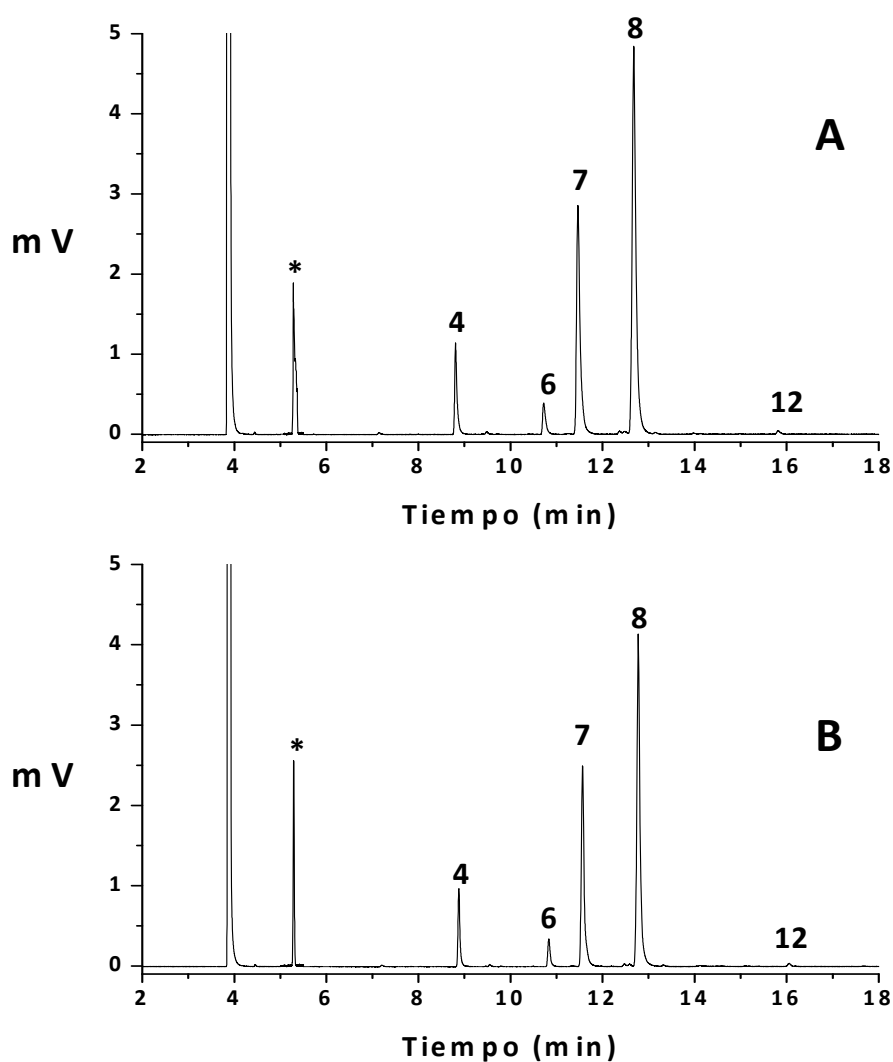


Figura VII.3.- Cromatograma obtenido para la muestra BAGL inicial (A) y tras seis meses de almacenamiento a +4 °C (B). (*Patrón interno, de concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En ella se observa que ambos cromatogramas (inicial y tras seis meses de almacenamiento a +4 °C) son similares, aunque la intensidad de los picos cromatográficos disminuye ligeramente después de seis meses de almacenamiento, lo que pone de manifiesto una degradación de la muestra. Análogos resultados se observan para la muestra BAGL almacenada a temperatura ambiente, aunque lógicamente la disminución de las áreas de pico es mayor.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de utilizar antioxidantes con objeto de evitar la degradación de las muestras de biodiesel durante un periodo de tiempo mayor.

Con respecto a las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de semillas, BASL y BASF, los resultados obtenidos fueron muy similares a los mostrados para las muestras de BAGL y BAGF. La concentración total de FAMES de la muestra BASL conservada a temperatura ambiente es del 97,2 %, mientras que para la muestra BASF es del 96,8 %, hasta el segundo

mes de almacenamiento. De la misma manera que ocurre con las muestras de biodiesel de aceite de girasol, se observa que el contenido en FAMES va disminuyendo gradualmente durante el periodo de almacenamiento, desde el segundo hasta el sexto mes estudiado, siendo la concentración total de FAMES del 64,3 % y 66,6 % para la muestra de BASL y BASF, respectivamente. Por lo tanto, las muestras de biodiesel procedentes de aceite de semillas almacenadas a temperatura ambiente sólo cumplirían con lo especificado en la normativa europea hasta el segundo mes de almacenamiento. En relación a las muestras conservadas a +4 °C, los contenidos totales de FAMES obtenidos fueron del 97,3 % para BASL y del 97,8 % para BASF conservadas durante tres meses, disminuyendo estos contenidos hasta el 89,8 % y 87,4 %, respectivamente, en el sexto mes de almacenamiento. Por lo tanto, y al igual que ocurría con las muestras de biodiesel procedentes de aceite de girasol, la concentración de FAMES parece estabilizarse al disminuir la temperatura de almacenamiento, aunque en ambos casos las muestras sólo cumplirían con lo especificado en la normativa europea hasta el tercer mes de almacenamiento.

A la vista de los resultados obtenidos, cabe indicar que las muestras de biodiesel estudiadas (procedentes de aceites de girasol y de semillas) presentan un comportamiento similar en cuanto al contenido de FAMES durante el periodo de tiempo estudiado, lo que pone de manifiesto que la materia prima empleada en la producción del biodiesel no tiene influencia en su estabilidad, ya sean conservadas a temperatura ambiente o a +4 °C. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para el periodo de inducción o estabilidad a la oxidación (Capítulo VI), donde la mitad de los biodiesel obtenidos tenían un periodo de inducción inferior a 6.

VII.3 Empleo de antioxidantes para la conservación de las muestras de biodiesel

La adición de un antioxidante adecuado al biodiesel permite mejorar su estabilidad a la oxidación durante el tiempo de almacenamiento desde su producción hasta la comercialización final del producto, de forma que el biodiesel cumpla con las especificaciones exigidas en la normativa europea en relación al contenido en FAMES. El tratamiento con inhibidores de la oxidación que contienen fenoles en su estructura es el método más comúnmente empleado para incrementar la estabilidad oxidativa del biodiesel. Las concentraciones de antioxidantes más frecuentemente utilizadas varían entre 100 y 1.000 mg L⁻¹ (García-Pérez *et al.*, 2010). En la Tabla VII.2 se recogen los antioxidantes estudiados, junto con sus estructuras químicas y los acrónimos utilizados.

Tabla VII.2.- Nombre, acrónimo y estructura química de los antioxidantes estudiados.

Nombre IUPAC	Acrónimo	Fórmula química
3-tert-butil-4-hidroxianisol	BHA	
3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno	BHT	
2,4,5-trihidroxi-4-propilfenona	THBP	
2,6-di-tert-butil-4-(hidroximetil)fenol	IO	
Etoxiquin	ET	
Ácido nordihidroguaiarético	NDGA	
Tert-butil hidroquinona	TBHQ	
Octil galato	OG	
Propil galato	PG	
Dodecil galato	DG	

La influencia de la presencia de antioxidantes en la estabilidad del biodiesel se ha estudiado en biocombustibles obtenidos a partir de aceites de fritura, ya que son los que presentan una mayor degradación. En la Tabla VII.3 se muestra el contenido inicial de FAMES en el biodiesel obtenido a partir de aceite de girasol de fritura (BAGF).

Tabla VII.3.- Composición inicial, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de girasol de fritura.

FAMES	% FAMES
(C16:0)	5,30 \pm 0,01
(C18:0)	2,30 \pm 0,05
(C18:1)	29,5 \pm 0,2
(C18:2)	62,5 \pm 0,3
(C22:0)	0,30 \pm 0,04
% Total	99,8 \pm 0,4

Se observa que la muestra de biodiesel cumple inicialmente con lo especificado en la normativa europea, puesto que el contenido total de FAMES obtenido es del 99,8 %, superior al valor mínimo de 96,5 % establecido en la UNE-EN 14103:2003.

A continuación, se añadieron a esta muestra de biodiesel concentraciones conocidas (100, 500 y 1.000 mg L⁻¹) de cada uno de los antioxidantes estudiados. Las muestras de biodiesel adicionadas se almacenaron durante tres y seis meses en frascos de color topacio, en ausencia de luz y a temperatura ambiente, determinándose el contenido total de FAMES para cada una de ellas. Los resultados obtenidos para las muestras de biodiesel almacenadas durante tres meses se recogen en las Tablas VII.4 (antioxidantes BHA y BHT), VII.5 (antioxidantes THBP e IO), VII.6 (antioxidantes ET y NDGA), VII.7 (antioxidantes TBHQ y OG) y VII.8 (antioxidantes PG y DG).

Tabla VII.4.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de BHA y BHT, transcurridos tres meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	BHA			BHT		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
(C16:0)	4,01 \pm 0,02	4,15 \pm 0,02	4,21 \pm 0,04	4,05 \pm 0,02	4,10 \pm 0,03	4,16 \pm 0,02
(C18:0)	1,98 \pm 0,04	2,04 \pm 0,01	2,15 \pm 0,03	1,86 \pm 0,01	1,90 \pm 0,03	2,01 \pm 0,05
(C18:1)	26,7 \pm 0,3	27,9 \pm 0,1	28,2 \pm 0,3	26,1 \pm 0,4	27,7 \pm 0,3	27,9 \pm 0,4
(C18:2)	58,4 \pm 0,2	59,1 \pm 0,2	59,8 \pm 0,3	59,7 \pm 0,2	60,4 \pm 0,5	60,8 \pm 0,2
(C22:0)	*n.d.	0,17 \pm 0,02	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.
% Total	91,1 \pm 0,4	93,4 \pm 0,2	94,4 \pm 0,4	91,7 \pm 0,4	94,1 \pm 0,6	94,9 \pm 0,5

*n.d.: no detectado

Tabla VII.5.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de THBP e IO, transcurridos tres meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	THBP			IO		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
(C16:0)	4,96 \pm 0,05	5,10 \pm 0,02	5,11 \pm 0,07	4,04 \pm 0,03	4,53 \pm 0,05	4,02 \pm 0,02
(C18:0)	2,01 \pm 0,02	2,16 \pm 0,05	2,11 \pm 0,03	1,72 \pm 0,03	1,79 \pm 0,01	1,83 \pm 0,04
(C18:1)	28,1 \pm 0,3	29,1 \pm 0,3	29,2 \pm 0,3	28,1 \pm 0,4	28,9 \pm 0,5	27,4 \pm 0,3
(C18:2)	61,1 \pm 0,2	62,2 \pm 0,4	62,4 \pm 0,5	59,8 \pm 0,2	61,5 \pm 0,4	59,9 \pm 0,4
(C22:0)	0,09 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01	*n.d.	0,13 \pm 0,02	*n.d.
% Total	96,3 \pm 0,4	98,6 \pm 0,5	99,0 \pm 0,6	93,7 \pm 0,4	96,9 \pm 0,6	93,2 \pm 0,5

*n.d.: no detectado

Tabla VII.6.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de ET y NDGA, transcurridos tres meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	ET			NDGA		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
(C16:0)	4,10 \pm 0,01	4,50 \pm 0,07	4,04 \pm 0,04	4,10 \pm 0,08	4,54 \pm 0,04	4,65 \pm 0,04
(C18:0)	1,61 \pm 0,04	1,80 \pm 0,03	1,74 \pm 0,03	1,71 \pm 0,04	1,83 \pm 0,06	1,70 \pm 0,05
(C18:1)	28,7 \pm 0,4	28,5 \pm 0,2	28,1 \pm 0,3	29,2 \pm 0,4	29,5 \pm 0,2	29,1 \pm 0,3
(C18:2)	59,3 \pm 0,3	61,4 \pm 0,5	59,6 \pm 0,4	60,3 \pm 0,5	61,4 \pm 0,2	60,6 \pm 0,6
(C22:0)	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	0,11 \pm 0,03	*n.d.
% Total	95,9 \pm 0,5	97,1 \pm 0,5	96,0 \pm 0,5	95,3 \pm 0,6	97,4 \pm 0,3	96,1 \pm 0,7

*n.d.: no detectado

Tabla VII.7.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de TBHQ e OG transcurridos tres meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	TBHQ			OG		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)
(C16:0)	4,9 \pm 0,1	5,10 \pm 0,01	4,88 \pm 0,02	4,90 \pm 0,03	5,01 \pm 0,02	5,12 \pm 0,03
(C18:0)	2,10 \pm 0,01	1,90 \pm 0,03	2,10 \pm 0,04	2,01 \pm 0,04	1,91 \pm 0,03	2,12 \pm 0,02
(C18:1)	28,8 \pm 0,2	28,7 \pm 0,3	28,9 \pm 0,4	28,7 \pm 0,3	28,5 \pm 0,3	29,3 \pm 0,2
(C18:2)	61,7 \pm 0,4	62,0 \pm 0,4	61,3 \pm 0,5	59,4 \pm 0,2	61,6 \pm 0,5	61,9 \pm 0,2
(C22:0)	0,20 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02	*n.d	0,20 \pm 0,03	0,20 \pm 0,01
% Total	97,7 \pm 0,5	97,8 \pm 0,5	97,4 \pm 0,6	95,0 \pm 0,4	97,2 \pm 0,6	98,6 \pm 0,3

*n.d.: no detectado

Tabla VII.8.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de PG y DG, transcurridos tres meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	PG			DG		
	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)
(C16:0)	4,60 \pm 0,02	4,68 \pm 0,01	4,96 \pm 0,05	5,01 \pm 0,02	5,11 \pm 0,01	5,21 \pm 0,03
(C18:0)	1,78 \pm 0,03	1,80 \pm 0,03	1,95 \pm 0,03	1,91 \pm 0,04	2,05 \pm 0,03	2,18 \pm 0,06
(C18:1)	29,2 \pm 0,1	29,4 \pm 0,3	29,5 \pm 0,3	28,9 \pm 0,3	29,5 \pm 0,4	29,9 \pm 0,2
(C18:2)	61,4 \pm 0,4	61,6 \pm 0,2	61,9 \pm 0,4	59,4 \pm 0,2	61,5 \pm 0,3	61,8 \pm 0,6
(C22:0)	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	0,12 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02
% Total	97,0 \pm 0,4	97,5 \pm 0,4	98,3 \pm 0,5	95,2 \pm 0,4	98,3 \pm 0,5	99,2 \pm 0,6

*n.d.: no detectado

Los resultados obtenidos muestran que los antioxidantes BHA y BHT mejoran la estabilidad del biodiesel al aumentar la concentración, en el intervalo estudiado. Se observa además que lo especificado por la normativa europea en referencia al contenido de FAMES (un valor mínimo del 96,5 %) no se verifica a cualquiera de las concentraciones estudiadas, durante un periodo de almacenamiento de tres meses.

Todos los antioxidantes, excepto IO, ET y NDGA, mejoran la estabilidad del biodiesel al aumentar su concentración en la muestra, mientras que estos tres antioxidantes presentan los mejores resultados a una concentración de 500 mg L⁻¹, cumpliendo además con la mínima concentración de FAMES permitida. Los antioxidantes THBP, OG y DG consiguen mantener la

proporción de FAMES por encima del 96,5 % a concentraciones de 500 mg L⁻¹ y el TBHQ y PG lo hacen a concentraciones de 100 mg L⁻¹.

Para una correcta distribución del biodiesel, éste debería poder ser almacenado como mínimo durante seis meses, por lo que el estudio anterior se amplió a seis meses de almacenamiento. En las Tablas VII.9 (antioxidantes BHA y BHT), VII.10 (antioxidantes THBP e IO), VII.11 (antioxidantes ET y NDGA), VII.12 (antioxidantes TBHQ y OG) y VII.13 (antioxidantes PG y DG) se muestran los resultados obtenidos.

Tabla VII.9.- Composición, en % (media ± desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de BHA y BHT, transcurridos seis meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	BHA			BHT		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
(C16:0)	3,45 ± 0,02	3,56 ± 0,02	3,81 ± 0,03	3,74 ± 0,02	3,86 ± 0,03	3,92 ± 0,01
(C18:0)	1,42 ± 0,05	1,53 ± 0,03	1,58 ± 0,04	1,35 ± 0,03	1,42 ± 0,04	1,49 ± 0,03
(C18:1)	25,4 ± 0,4	25,9 ± 0,1	26,3 ± 0,3	24,7 ± 0,3	25,3 ± 0,2	25,8 ± 0,3
(C18:2)	56,2 ± 0,3	56,8 ± 0,2	57,2 ± 0,5	56,1 ± 0,4	56,8 ± 0,2	57,1 ± 0,5
(C22:0)	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.
% Total	86,5 ± 0,5	87,8 ± 0,2	88,9 ± 0,6	85,9 ± 0,5	87,4 ± 0,3	88,3 ± 0,6

*n.d.: no detectado

Tabla VII.10.- Composición, en % (media ± desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de THBP e IO, transcurridos seis meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	THBP			IO		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
(C16:0)	4,21 ± 0,01	4,53 ± 0,02	4,43 ± 0,05	3,89 ± 0,05	3,95 ± 0,02	3,94 ± 0,04
(C18:0)	1,86 ± 0,03	1,89 ± 0,05	1,93 ± 0,03	1,55 ± 0,03	1,58 ± 0,03	1,65 ± 0,03
(C18:1)	27,8 ± 0,4	28,3 ± 0,3	28,9 ± 0,3	27,5 ± 0,3	27,6 ± 0,3	26,8 ± 0,4
(C18:2)	60,8 ± 0,2	61,7 ± 0,2	61,9 ± 0,4	58,4 ± 0,4	59,1 ± 0,6	56,4 ± 0,2
(C22:0)	0,04 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,01	*n.d.	*n.d.	*n.d.
% Total	94,7 ± 0,4	96,5 ± 0,4	97,3 ± 0,5	91,3 ± 0,5	92,2 ± 0,7	88,8 ± 0,4

*n.d.: no detectado

Tabla VII.11.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de ET y NDGA, transcurridos seis meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	ET			NDGA		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
(C16:0)	3,40 \pm 0,06	3,30 \pm 0,01	3,20 \pm 0,07	3,30 \pm 0,02	3,41 \pm 0,01	3,41 \pm 0,05
(C18:0)	1,50 \pm 0,03	1,39 \pm 0,06	1,21 \pm 0,04	1,30 \pm 0,03	1,52 \pm 0,06	1,38 \pm 0,04
(C18:1)	27,1 \pm 0,3	27,4 \pm 0,4	27,8 \pm 0,6	26,1 \pm 0,3	27,4 \pm 0,4	27,8 \pm 0,3
(C18:2)	48,4 \pm 0,3	51,6 \pm 0,5	56,1 \pm 0,2	58,4 \pm 0,6	59,9 \pm 0,4	59,5 \pm 0,2
(C22:0)	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.
% Total	80,4 \pm 0,4	83,7 \pm 0,6	88,3 \pm 0,6	89,1 \pm 0,7	92,2 \pm 0,6	92,1 \pm 0,4

*n.d.: no detectado

Tabla VII.12.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de TBHQ e OG, transcurridos seis meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	TBHQ			OG		
	100 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)
(C16:0)	4,50 \pm 0,02	4,6 \pm 0,1	4,50 \pm 0,07	4,10 \pm 0,01	4,40 \pm 0,02	4,80 \pm 0,01
(C18:0)	1,80 \pm 0,03	1,70 \pm 0,07	1,90 \pm 0,03	0,90 \pm 0,02	1,01 \pm 0,04	1,11 \pm 0,02
(C18:1)	28,7 \pm 0,2	28,6 \pm 0,2	28,5 \pm 0,2	26,1 \pm 0,3	27,2 \pm 0,3	27,8 \pm 0,1
(C18:2)	61,4 \pm 0,2	61,6 \pm 0,3	61,9 \pm 0,2	58,4 \pm 0,5	58,6 \pm 0,1	59,8 \pm 0,3
(C22:0)	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	*n.d.	*n.d.	*n.d.
% Total	96,5 \pm 0,3	96,6 \pm 0,4	96,9 \pm 0,3	89,5 \pm 0,5	91,2 \pm 0,3	93,5 \pm 0,3

*n.d.: no detectado

Tabla VII.13.- Composición, en % (media \pm desviación estándar, n=3), de los FAMES presentes en las muestras de BAGF adicionadas con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de PG y DG, transcurridos seis meses desde su adición.

FAMES	% FAMES					
	PG			DG		
	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)
(C16:0)	3,40 \pm 0,02	3,30 \pm 0,01	3,98 \pm 0,01	4,91 \pm 0,01	4,90 \pm 0,02	4,96 \pm 0,04
(C18:0)	1,56 \pm 0,04	1,65 \pm 0,06	1,71 \pm 0,04	0,90 \pm 0,01	1,01 \pm 0,04	1,11 \pm 0,05
(C18:1)	27,9 \pm 0,3	28,4 \pm 0,4	28,8 \pm 0,3	26,1 \pm 0,3	28,2 \pm 0,3	29,1 \pm 0,1
(C18:2)	59,8 \pm 0,3	59,5 \pm 0,5	59,9 \pm 0,2	56,8 \pm 0,5	60,6 \pm 0,2	61,4 \pm 0,6
(C22:0)	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.	*n.d.
% Total	92,7 \pm 0,4	92,9 \pm 0,6	94,4 \pm 0,4	88,7 \pm 0,6	94,7 \pm 0,4	96,6 \pm 0,6

*n.d.: no detectado

En general, se aprecia una disminución importante en la concentración de FAMES después de seis meses de almacenamiento, con respecto a la concentración después de tres meses, de manera que la normativa europea se verificaría en pocas ocasiones. De esta forma, se observa que únicamente el TBHQ a cualquiera de las tres concentraciones estudiadas (Tabla VII.12), el THBP a las concentraciones de 500 y 1.000 mg L⁻¹ (Tabla VII.10) y el DG a una concentración de 1.000 mg L⁻¹ (Tabla VII.13) permitirían conservar el biodiesel durante seis meses, cumpliendo con lo especificado en la normativa europea. El resto de antioxidantes estudiados no serían adecuados, ya que no verificarían la norma europea a ninguna de las tres concentraciones estudiadas.

Para una mejor comparación de los resultados, los contenidos totales en FAMES obtenidos para la muestra BAGF, para las tres concentraciones de antioxidante estudiadas, durante un tiempo de almacenamiento de tres y seis meses, se muestran en las Figuras VII.4 y VII.5, respectivamente.

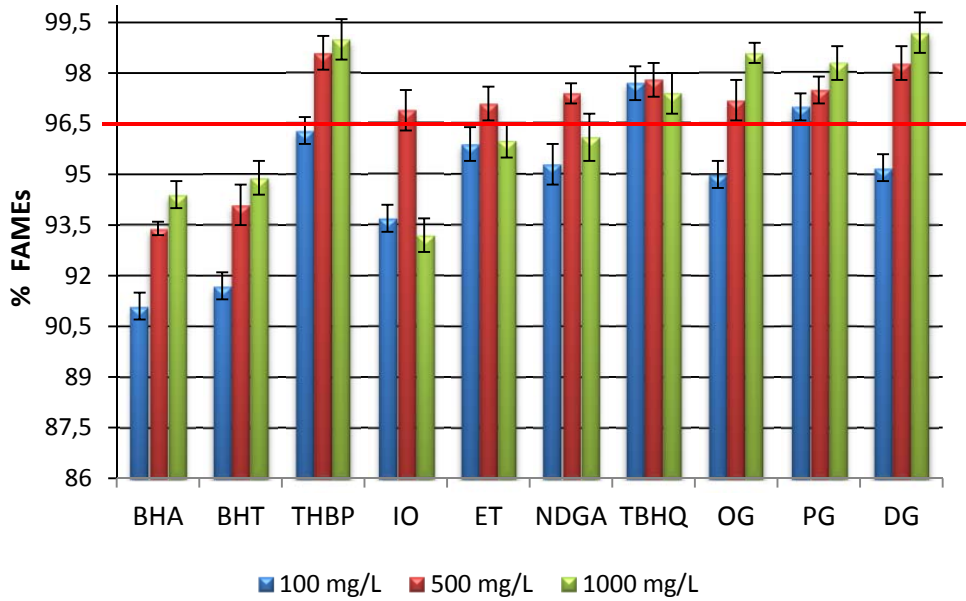


Figura VII.4.- Contenidos totales en FAMES, obtenidos mediante GC-FID, para la muestra de BAGF, adicionada con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de diferentes antioxidantes y almacenada a temperatura ambiente durante tres meses.

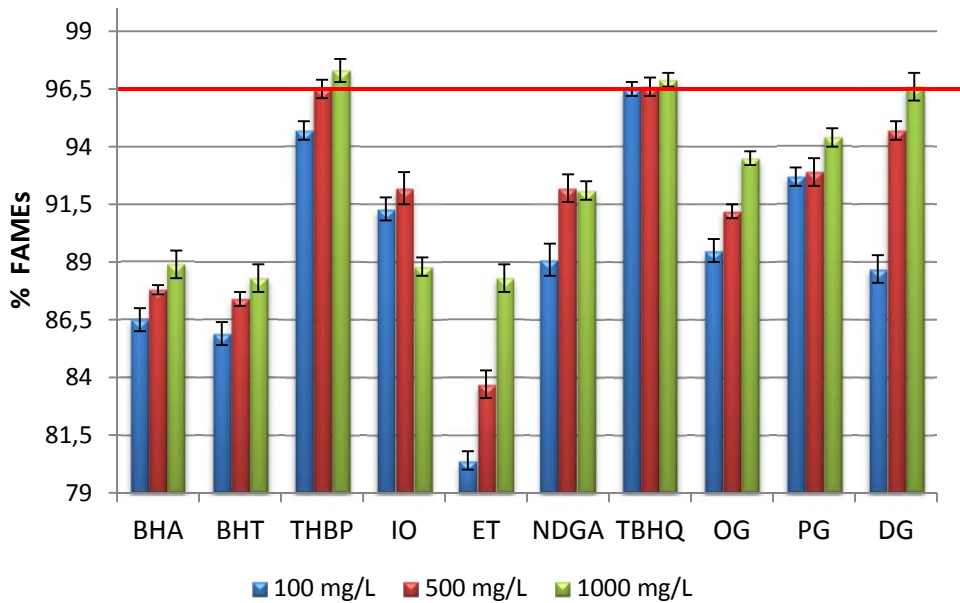


Figura VII.5.- Contenidos totales en FAMES, obtenidos mediante GC-FID, para una muestra de BAGF, adicionada con 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹ de diferentes antioxidantes y almacenada a temperatura ambiente durante seis meses.

A la vista de los resultados obtenidos, cabe destacar que a los tres meses de almacenamiento sólo los antioxidantes ET, TBHQ y PG a cualquiera de las tres concentraciones estudiadas, y el THBP, IO, NDGA, OG y DG a alguna de ellas, permiten mantener el contenido de FAMEs al nivel mínimo exigido en la normativa europea, mientras que después de seis meses sólo el THBP, TBHQ y DG lo consiguen a diferentes concentraciones.

En la Tabla VII.14 se resume la idoneidad de los antioxidantes estudiados, a los tres niveles de concentración añadidos y a tres y seis meses de almacenamiento de la muestra de BAGF, de acuerdo con la verificación de la normativa europea UNE-EN 14103:2003.

Tabla VII.14.- Idoneidad de los antioxidantes estudiados de acuerdo con la verificación de la normativa europea UNE-EN 14103:2003 (contenido total de FAMEs mayor o igual a 96,5 %).

Antioxidante	3 meses			6 meses		
	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)	100 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	1.000 (mg L ⁻¹)
BHA						
BHT						
THBP		✓	✓		✓	✓
IO		✓				
ET		✓	✓			
NDGA		✓				
TBHQ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
OG		✓	✓			
PG	✓	✓	✓			
DG		✓	✓			✓

El TBHQ parece ser el mejor antioxidante entre los diez estudiados, ya que tanto a tres como a seis meses de almacenamiento, y a las tres concentraciones estudiadas, se verificaría la normativa europea, si bien es cierto que a los seis meses de almacenamiento el contenido de FAMEs estaría muy próximo al valor mínimo determinado por dicha normativa. Por otro lado, este es el único antioxidante entre los estudiados que verificaría la norma europea a la menor concentración estudiada, es decir, 100 mg L⁻¹.

Los resultados obtenidos mediante este método (determinación del contenido total de FAMEs) son similares a los obtenidos por otros autores que han estudiado la estabilidad a la oxidación de las muestras del biodiesel, tratadas con antioxidantes, utilizando el método "Rancimat" según la norma UNE-EN 14112:2003, que consiste en la determinación del periodo de inducción de las muestras de biodiesel. Sin embargo, la determinación del contenido total de FAMEs presentes en el biodiesel, tratado con antioxidantes y almacenado durante un determinado periodo de tiempo, permite conocer uno de los parámetros de mayor importancia para la comercialización de este tipo de biocombustibles con plenas garantías de uso en los motores diésel.

VII.4 Conclusiones

- La composición de FAMES en el biodiesel va disminuyendo con el tiempo, incluso en presencia de antioxidantes, aunque a menor velocidad.
- La temperatura de almacenamiento tiene influencia en la estabilidad de las muestras de biodiesel, de forma que una temperatura de +4 °C es más adecuada para la conservación de las muestras que la temperatura ambiente. Sin embargo, el contenido total de FAMES a ambas temperaturas no permite verificar la normativa europea a tiempos superiores a los tres meses de almacenamiento.
- Las muestras de biodiesel estudiadas (girasol y semillas, sin usar y de fritura) presentan contenidos de FAMES similares durante el periodo de tiempo de almacenamiento estudiado, a temperatura ambiente o a +4 °C, lo que parece indicar que la materia prima empleada en la obtención del biodiesel no tiene influencia sobre la estabilidad a la oxidación del mismo.
- El empleo de antioxidantes mejora la estabilidad frente a la oxidación del biodiesel obtenido a partir de aceite de girasol de fritura, cuando éstos se añaden en el momento de su producción.
- Los mejores antioxidantes para llevar a cabo el almacenamiento de las muestras de biodiesel estudiadas, durante un tiempo mínimo de seis meses, han resultado ser el TBHQ (a 100, 500 y 1.000 mg L⁻¹), el THBP (a 500 y 1.000 mg L⁻¹) y el DG (a 1.000 mg L⁻¹). Por tanto, el TBHQ es el que se puede utilizar en menor concentración, pero en cualquier caso, la selección del antioxidante debe contemplar también consideraciones económicas.

CAPÍTULO VIII

DETERMINACIÓN DE METALES Y SEMIMETALES EN MUESTRAS DE ACEITE Y BIODIESEL MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-AES)

En este capítulo se ha llevado a cabo la determinación de 19 elementos metálicos y semimetálicos (aluminio, arsénico, bario, calcio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, fósforo, plomo, vanadio y cinc) en muestras de biodiesel, obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina, y en los aceites vegetales empleados como materias primas para su producción, mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES). Para ello, fue necesario realizar una optimización previa del método de digestión ácida en horno de microondas para este tipo de muestras. Asimismo, la calidad de las muestras de biodiesel, en cuanto al contenido metálico legislado, fue evaluada mediante la aplicación de las normas UNE-EN 14538:2006 *“Productos derivados de grasa y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de calcio, potasio, magnesio y sodio por análisis espectral de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP OES)”* y UNE-EN 14107:2003 *“Productos derivados de grasa y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de fósforo mediante espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivo (ICP)”*. Estas normas también fueron empleadas para el análisis de los contenidos de estos cinco elementos en las muestras de aceite empleadas como materia prima en la producción del biodiesel.

VIII.1 Antecedentes

VIII.1.1 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos en aceites

La determinación de elementos esenciales y tóxicos o potencialmente tóxicos ha adquirido una notable importancia en el ámbito de la nutrición humana en los últimos años, tanto desde el punto de vista fisiológico como para el control de calidad y tecnología de los alimentos. Son numerosos los estudios realizados sobre la presencia de dichos elementos en la gran mayoría de los alimentos que componen la dieta habitual, incluyendo aceites comestibles, a pesar de la elevada complejidad analítica que presenta este tipo de muestras.

La contaminación de aceites vegetales por metales y otros contaminantes medioambientales puede ocurrir independientemente del método de producción empleado. Los metales pueden alcanzar las áreas agrícolas en las que se cultivan las semillas oleaginosas con las que se produce el aceite vegetal a través de emisiones de gases, mediante deposiciones del tráfico de vehículos y por los gases emitidos a la atmósfera por las industrias ubicadas próximas a los campos de cultivo. Otra fuente de contaminación son los lodos de aguas residuales con los que podrían regarse las zonas de cultivo.

La presencia de metales en aceites de consumo es un factor a tener muy en cuenta debido al destacado interés toxicológico que presentan algunos de ellos, como plomo o cadmio, que pueden estar presentes con cierta frecuencia en aceites en concentraciones relativamente elevadas (Jiménez *et al.*, 1995). La ausencia de antioxidantes o la presencia de pro-oxidantes como hierro, cobre, cobalto, cromo o manganeso puede ejercer una notable influencia en los procesos de oxidación o enranciamiento del aceite, produciéndose cambios en el sabor y sobre la estabilidad, y alterándose los índices de calidad del aceite, tales como el índice de acidez o de peróxidos (Paz Antolin, 2001; Zeiner *et al.*, 2005). El cinc es un elemento esencial para el organismo en pequeñas cantidades, pero puede llegar a ser tóxico en cantidades elevadas. Además, su presencia en los suelos reduce la absorción del cadmio por parte de las plantas oleaginosas (Pehlivan *et al.*, 2008).

La mayoría de los metales se encuentran presentes en pequeñas cantidades en los aceites crudos, y la mayor parte son eliminados durante los procesos de refinado. Durante el proceso de elaboración de aceites a partir de semillas oleaginosas, pueden aportarse trazas metálicas, fundamentalmente durante la fase de la molienda, sobre todo si se realiza empleando molinos metálicos. Se recomienda el empleo de acero inoxidable en las paredes y paletas de las batidoras para evitar este problema, así como en los tamices empleados para la separación de fases líquidas y en los depósitos de almacenamiento (Paz Antolin, 2001; Lendinez, 2004).

El hierro y el cobre son elementos esenciales para las plantas, puesto que el hierro facilita la respiración y el transporte de oligoelementos y el cobre es un elemento fundamental

en la fotosíntesis y en la fase de reproducción de las plantas. La abundancia de los compuestos de hierro en la naturaleza justifica su presencia en todos los productos vegetales y animales. Las variaciones en las concentraciones de este metal en aceites vegetales dependen, a menudo, más del lugar de cultivo que de la propia naturaleza de la semilla oleaginosa. La carencia de hierro en suelos ácidos puede deberse a la interacción de este elemento con un exceso de metales pesados (Martín-Lagos, 2007). Con respecto al cobre, son muchos los productos fitosanitarios que se emplean en los cultivos de las semillas oleaginosas como insecticidas, fungicidas, bactericidas, acaricidas o herbicidas, que pueden contener cantidades considerables de este elemento, y además, el cobre se utiliza, junto con el níquel, durante el proceso de obtención de aceite como catalizadores de la reacción de hidrogenación del aceite.

Por otro lado, el cobre y el hierro pueden ser contaminantes potenciales de los aceites, principalmente debido a trazas metálicas presentes en los procesos de obtención y tanques de almacenamiento. También es posible que el cobre, junto con el plomo, pueda estar presentes en los aceites debido a la contaminación ambiental de las semillas empleadas como materia prima (Zeiner *et al.*, 2005). La capacidad pro-oxidativa de estos elementos es bien conocida, ya que actúan como catalizadores en la primera etapa del proceso de oxidación catalítica de aceites y grasas en presencia de oxígeno, originando alcoholes o radicales libres, obtenidos a partir de peróxidos e hidroperóxidos, que favorecen el inicio de este proceso. Estos radicales desencadenan toda una serie de reacciones que originan compuestos volátiles como aldehídos y cetonas, que son los responsables del característico olor a rancio y del cambio de sabor de los aceites vegetales, y finalmente son oxidados a los correspondientes ácidos carboxílicos (Choe *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006). La formación de estos compuestos da lugar a pérdidas de calidad del aceite, provocando alteraciones no sólo en sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales, sino también en la calidad organoléptica. El cobre es un pro-oxidante muy efectivo a concentraciones inferiores a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$, y diversos estudios señalan que su poder catalítico es superior al del hierro. El cobre ejerce efectos perjudiciales durante el periodo de almacenamiento del aceite y sobre la decoloración de los lípidos. Además, se ha observado que elevadas concentraciones de este elemento están relacionadas con un aumento del grado de acidez del aceite (Romano *et al.*, 2007).

El cromo se encuentra en pequeñas cantidades en la mayoría de los alimentos. El procesado tecnológico puede incorporar este elemento a los aceites vegetales ya que el acero inoxidable contiene entre un 11 y un 30 % de cromo, que puede cederse a los aceites, sobre todo cuando el medio es ácido. Al igual que hierro y cobre, el cromo ejerce un importante efecto negativo en la estabilidad de los aceites, junto con el manganeso. Este metal es considerado como un elemento traza tóxico pero esencial, lo cual significa que es necesario para la supervivencia pero tóxico cuando está presente en elevadas concentraciones. Las concentraciones normales de manganeso encontradas en las semillas de girasol y de sésamo son de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ (Roca *et al.*, 2000; Lendínez., 2004).

El plomo es un contaminante ambiental que se encuentra en fertilizantes, productos fitosanitarios y disolventes empleados en la extracción del aceite (Roca *et al.*, 2001) y cuyos efectos toxicológicos son bien conocidos. Este metal se suele emplear en la fabricación de numerosos materiales utilizados en el proceso de refinado de los aceites vegetales como vidrios, maquinaria de la industria alimentaria, conducciones, aleaciones metálicas, etc. Todos los procesos y operaciones relacionados con la producción y los propios productos contribuyen a una descarga considerable de este elemento al medio ambiente.

Aunque existen discrepancias entre la bibliografía consultada, la teoría más aceptada considera que la acumulación de plomo en los vegetales se debe principalmente a la contaminación atmosférica, que supone entre un 73-95 % de la carga total de este metal, mientras que sólo una pequeña parte corresponde a la absorción del plomo presente en el suelo, aunque elevados niveles de este metal se corresponden con el empleo de plaguicidas organofosforados en los campos de cultivos de semillas oleaginosas (Angioni *et al.*, 2006). El plomo es muy persistente, presenta una elevada vida media biológica y un gran carácter tóxico, por lo que su determinación es importante en cualquier producto alimenticio, incluidos aceites y grasas comestibles. Su acción tóxica se extiende a todo el organismo, si bien este metal se deposita preferentemente en ciertos órganos, como hígado y riñón.

La presencia de arsénico en aceites de consumo, según la bibliografía consultada, no ha sido muy estudiada. Sin embargo, este elemento puede estar presente en los aceites vegetales debido a su posible absorción por parte de las plantas oleaginosas del suelo donde se cultiva o a su incorporación durante el proceso de producción y almacenamiento. Además, hay que tener en cuenta que los fertilizantes o plaguicidas empleados en los campos de cultivos son fuentes potenciales de este semimetal, lo que conduce a la posible aparición de especies de arsénico en los aceites vegetales.

Por todo lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que el análisis de los aceites vegetales que se emplean como materia prima en la producción de biodiesel es un factor muy importante para garantizar la calidad del mismo, además de proporcionar información de mucha utilidad para conocer la composición del suelo en el cual se cultivan las semillas oleaginosas que se utilizan en la producción de biocombustibles. De esta forma, se podría estudiar la presencia y disponibilidad de elementos metálicos y semimetálicos en los aceites que procedan de la absorción del suelo por parte de las plantas oleaginosas, cuya existencia podría modificar la estabilidad del biodiesel obtenido, acelerando los procesos oxidativos (Chaves *et al.*, 2010).

Las técnicas más empleadas para la determinación de metales en muestras de aceite son la espectrometría de absorción atómica con llama (F-AAS) (Nunes *et al.*, 2011) y con cámara de grafito (GF-AAS) (Roca *et al.*, 2000; Zeiner *et al.*, 2005; Matos Reyes *et al.*, 2006, Cindric *et al.*, 2007; Ansari *et al.*, 2009; Bakkali *et al.*, 2009; Mendil *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2009), la espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES)

(Zeiner *et al.*, 2005; Angioni *et al.*, 2006; Musa Özcan *et al.*, 2006; Cindric *et al.*, 2007; Pehlivan *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010; Sarin *et al.*, 2010) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Jiménez *et al.*, 2003; Şahan *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2010).

Zeiner *et al.* (2005) llevaron a cabo la determinación de varios elementos metálicos en muestras de aceite de oliva, previa digestión ácida en horno de microondas con una mezcla de HNO₃ y H₂O₂ 8:1 (v/v). Los elementos mayoritarios (Ca, Fe, Mg, Na y Zn) fueron analizados por ICP-AES y los minoritarios (Al, Co, Cu, K, Mn y Ni) por GF-AAS. Estos autores concluyeron que los contenidos de los diferentes elementos analizados en cada muestra de aceite de oliva eran función de la composición de los suelos y de los factores de bioacumulación de cada analito en los olivares.

Matos Reyes *et al.* (2006) determinaron Cu y Ni en aceites vegetales mediante GF-AAS pesando directamente la muestra no digerida en el tubo de grafito, colocándolo en la misma posición para poder obtener resultados reproducibles. Las concentraciones encontradas estaban por debajo de los µg g⁻¹, siendo los resultados equivalentes a los encontrados en la bibliografía para muestras similares, obtenidos mediante otros procedimientos de tratamiento de la muestra. Este método permitió realizar los análisis de los contenidos en metales en un menor tiempo, debido a la eliminación de la etapa de digestión.

Cindric *et al.* (2007) analizaron muestras de aceite obtenidas a partir de diferentes tipos de semillas oleaginosas, utilizando un método de mineralización de muestra basado en una digestión ácida asistida por horno microondas, empleando HNO₃ y H₂O₂ (2:1, v/v) como mezcla de digestión. Los elementos metálicos mayoritarios (Ca, Fe, Mg, Na y Zn) fueron analizados mediante ICP-AES y los minoritarios (Al, Cu, Co, Cr, K, Ni, Mn y Pb) mediante GF-AAS. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los contenidos de los metales analizados en función de la procedencia y del tipo de aceite estudiado.

Pehlivan *et al.* (2008) analizaron el contenido en Cu, Fe, Mn, Co, Cr, Pb, Cd, Ni y Zn en 17 muestras de aceites vegetales comestibles mediante ICP-AES. El tratamiento previo aplicado a la muestra consistió en añadir 1,0 mL de una disolución de ácido nítrico diluida al 10 % (v/v) a 2,0-3,0 g de la muestra de aceite, mezclar completamente con ultrasonidos y calentar en un baño de agua a 50 °C durante 2 horas. Finalmente, se centrifugó la mezcla resultante durante 10 minutos, se retiró la capa acuosa ácida inferior y se enrasó a 25 mL con agua desionizada. Este método permitió obtener resultados muy reproducibles y con una buena precisión, sin necesidad de realizar una mineralización previa de la muestra de aceite.

Ansari *et al.* (2009) determinaron el contenido de Cd, Pb y Zn en 16 muestras de aceite de girasol de diferentes orígenes mediante una mineralización con HNO₃-H₂O₂ (2:1, v/v) y posterior análisis de las muestras digeridas mediante F-AAS. Bakkali *et al.* (2009) analizaron el contenido de trazas metálicas de Cd, Cr, Cu, Mn, y Pb en diferentes tipos de aceites vegetales de distinta procedencia (España y Marruecos) mediante GF-AAS, realizando un tratamiento

previo de las muestras mediante digestión con horno de microondas con una mezcla ácida $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (3:1, v/v). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el contenido de metales dependía del aceite analizado, y en el caso del aceite de oliva, variaba dependiendo del país de procedencia, obteniéndose unos elevados contenidos de plomo en las muestras producidas en Marruecos.

VIII.1.2 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos en biodiesel

El biodiesel obtenido a partir de aceites vegetales es considerado como un combustible alternativo al diésel de petróleo, debido a que sus propiedades físico-químicas son similares, por lo que su empleo permite reducir las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera y, al ser fácilmente biodegradable, no incide negativamente en la contaminación de suelos, por lo que su toxicidad es mucho menor. Normalmente el biodiesel se comercializa como mezclas con el diésel hasta un 20 % como máximo, aunque en la actualidad se puede llegar a comercializar puro. Este tipo de mezclas ayuda a mejorar los procesos de ignición en los motores, aunque es fundamental asegurar la calidad del biodiesel para confirmar una buena combustión así como para preservar la integridad del motor.

El biodiesel puede ser bombeado, almacenado y manipulado empleando la misma infraestructura, equipos y procedimientos que normalmente se utilizan con el diésel convencional. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el biodiesel puro no es compatible con algunos metales y plásticos. De esta forma, si está en contacto durante periodos prolongados con Cu y/o aleaciones de Cu, Pb, Zn y Sn, puede empezar a degradarse y formar sedimentos sólidos, los cuales podrían causar la obstrucción de los filtros de combustible. Asimismo, el biodiesel puede perforar algunos plásticos comunes, como polietileno o polipropileno, si está en contacto prolongado con ellos. Por lo tanto, para el almacenamiento del biodiesel, se deben evitar los tanques revestidos con aleaciones que contengan Cu, Pb, Zn y Sn, ya que estos metales pueden catalizar reacciones químicas de degradación del biocombustible, por lo que los tanques de almacenamiento más adecuados son los de acero inoxidable, aluminio, polipropileno fluorado, polietileno fluorado, teflón y fibra de vidrio.

En los combustibles de origen fósil pueden encontrarse una gran variedad de metales, como Pb, Cd, As, S, Sb, Se, Ba, Cu, Mn, Ni, V, etc., los cuales son emitidos al medio ambiente en forma de partículas durante los procesos de combustión o acumulados en las cenizas de las calderas industriales. La combustión de gasolinas que contienen aditivos a base de Pb da lugar a cantidades importantes de plomo particulado en el medio ambiente, por lo que actualmente no se comercializan gasolinas con contenidos en este elemento altamente tóxico debido a su presencia en el aire que se respira, junto con la de otros elementos metálicos tóxicos, representa un grave peligro para la salud en función de la concentración presente y del tiempo a que se esté expuesto a estos contaminantes.

En general, la presencia de metales o semimetales en los combustibles es indeseable y, especialmente en un biocombustible, excepto si actúan como aditivos que mejoren alguna característica determinada. La existencia de metales alcalinos en los biocombustibles indica la presencia de restos de catalizadores empleados en su elaboración (sodio o potasio) o jabones solubles en el biodiesel que producen depósitos abrasivos que deterioran el motor o taponan los filtros de los motores. También pueden catalizar reacciones de polimerización no deseadas. Es necesario verificar que no se ha introducido ningún otro contaminante inorgánico durante el proceso de obtención del biodiesel, como el P, que suele proceder de la materia prima (Korn *et al.*, 2007). La presencia de P puede dañar los convertidores catalíticos, mientras que Ca, Mg, Na y K pueden contribuir al desgaste del inyector, de la bomba de combustible, de los pistones, etc., así como dar lugar a la formación de compuestos indeseables que originan la formación de depósitos en el motor.

Además, la estabilidad a la oxidación del biodiesel puede verse afectada por la presencia de metales, pudiendo incluso disminuir el tiempo de conservación antes de su comercialización (Holčapek *et al.*, 2001; Edlund *et al.*, 2002). Por lo tanto, los problemas asociados a la presencia de elementos metálicos en los biocombustibles pueden ser de índole económica, debido a la degradación o mal funcionamiento de los motores, así como medioambiental, debido a las emisiones atmosféricas de compuestos metálicos tóxicos, por lo que es necesario su análisis para evitar elevados niveles de contaminación atmosférica en las grandes ciudades (Saint’Pierre *et al.*, 2004).

La normativa europea sólo establece como necesario para evaluar la calidad de un biodiesel, desde el punto de vista del contenido metálico, la determinación del contenido de metales alcalinos (Na y K), alcalino térreos (Ca y Mg) y fósforo mediante ICP-AES, de acuerdo con las normas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003, respectivamente. La aplicación de estas normas requiere el empleo de disolventes orgánicos, tales como queroseno y xileno, así como de aceites orgánicos de diferente viscosidad. Asimismo, es necesario incorporar al plasma un gas auxiliar (oxígeno) con objeto de evitar la formación de depósitos de carbono en la antorcha del ICP. La norma europea UNE-EN 14214:2009 establece un valor máximo de 5,0 mg kg⁻¹ tanto para el contenido de Na + K como para el de Mg + Ca, al igual que la normativa americana (ASTM D6751-09). En cambio, para el contenido en fósforo la norma UNE-EN 14214:2009 establece un valor máximo de 4,0 mg kg⁻¹, mientras que la ASTM D6751-09 acepta un valor máximo de 10,0 mg kg⁻¹ de fósforo.

El resto de metales que pueden afectar a la calidad de un biodiesel como combustible en los motores diésel no se encuentran legislados, puesto que no se han establecido normativas ni a nivel europeo ni americano. Según Vieira *et al.* (2009), la normativa brasileña está ultimando una norma, todavía en periodo de discusión, para establecer un valor máximo permitido de arsénico en biodiesel, que probablemente quedará fijado en 5 mg kg⁻¹. De esta forma, se hace necesario disponer de procedimientos analíticos adecuados que permitan

determinar contenidos de arsénico en muestras de biodiesel a estos niveles, actualmente no descritas en las metodologías recomendadas.

Por lo tanto, se puede afirmar que el desarrollo de métodos analíticos para llevar a cabo la determinación y cuantificación de metales y semimetales en biocombustibles presenta un elevado interés tanto medioambiental como económico. Sin embargo, la problemática del análisis de este tipo de muestras reside en su naturaleza orgánica, lo que hace que la matriz presente una elevada complejidad.

Las técnicas espectrométricas atómicas más ampliamente empleadas en la determinación de metales y semimetales en biocombustibles son F-AAS (Chaves *et al.*, 2008a; de Jesús *et al.*, 2008, 2010; de Oliveira *et al.*, 2009; Lyra *et al.*, 2010), GF-AAS (Lobo *et al.*, 2009, 2011; Vieira *et al.*, 2009; Ghisi *et al.*, 2011), ICP-AES (Edlund *et al.*, 2002; dos Santos *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2010) e ICP-MS (Woods *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2008b, 2010; Amais *et al.*, 2010). Las técnicas ICP-AES e ICP-MS permiten llevar a cabo análisis multielemental con un amplio intervalo lineal y elevada sensibilidad, lo que permite determinar una amplia variedad de elementos metálicos en un menor tiempo de análisis. En cambio, las técnicas F-AAS y GF-AAS presentan un carácter monoelemental, con el consiguiente aumento del tiempo de análisis, por lo que no son las técnicas de análisis más adecuadas cuando se requiere la determinación de muchos elementos metálicos y/o semimetálicos en la muestra (Edlund *et al.*, 2002).

En general, las técnicas de análisis para la determinación del contenido total en metales en aceites vegetales y biocombustibles requieren que la muestra se encuentre en disolución acuosa, siendo ésta la etapa que más tiempo consume y que más problemas de reproducibilidad introduce en la determinación de elementos metálicos. La disolución de la muestra con cambio químico implica recurrir a una reacción química, para lo que se requiere la utilización de ácidos, oxidantes, etc. y la aplicación de elevadas temperaturas, lo que facilita la descomposición de la matriz de la muestra. Durante la etapa de tratamiento de muestra (mineralización), se deben evitar posibles errores debidos a pérdidas de analitos o contaminaciones procedentes de los reactivos y de los materiales empleados.

La digestión en horno de microondas emplea radiación electromagnética de 2450 MHz para disolver la muestra. Las microondas interaccionan con las moléculas polares, provocando el alineamiento del momento dipolar molecular con el campo de microondas. El campo cambia constantemente, lo que induce a la continua rotación de las moléculas, causando colisiones moleculares y produciendo calor. Las principales ventajas en el empleo de hornos de microondas son, entre otras, la automatización del sistema, que permite la programación del horno para la digestión de varias muestras simultáneamente, y los bajos tiempos de digestión requeridos, así como la seguridad del sistema, ya que suelen incorporar sondas de presión y temperatura que dan lugar a la cancelación del programa en caso de alcanzar valores superiores al límite programado.

Lobo *et al.* (2009) optimizaron un método de digestión ácida con HNO_3 y H_2O_2 (4,5:3, v/v), utilizando V_2O_5 como catalizador, para llevar a cabo la determinación de Cu, Pb, Ni y Cd en muestras de biodiesel mediante GF-AAS. Este método permitió obtener buenos resultados, aunque con el inconveniente de que la digestión de las muestras requirió un tiempo de 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente 1 hora en horno de microondas, por lo que este sistema no resultaría de mucha utilidad en un laboratorio de rutina debido al elevado tiempo necesario para poner las muestras en disolución acuosa.

En muchos trabajos de investigación se recurre a la formación de emulsiones y microemulsiones para la determinación de metales mediante técnicas espectrométricas atómicas. Una emulsión es un sistema heterogéneo compuesto por dos fases líquidas, una de ellas dispersa en la otra por medio de un proceso mecánico. Las emulsiones son sistemas inestables debido a la baja miscibilidad de las fases líquidas, aunque su estabilidad puede aumentar con la adición de surfactantes. En cambio, las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables compuestos por dos líquidos inmiscibles, uno de ellos disperso en el otro, en forma de micro-gotas, mediante un tercer líquido, que puede ser un surfactante o un co-disolvente (Chaves *et al.*, 2008; Amais *et al.*, 2010).

El empleo de microemulsiones ofrece algunas ventajas sobre los sistemas de emulsión, ya que son termodinámicamente más estables y, a la hora de realizar la calibración, permiten la utilización de disoluciones de referencia preparadas en medios acuosos en lugar de patrones organometálicos, que, generalmente, son muy caros e inestables. La preparación de microemulsiones para la determinación de metales en muestras de biodiesel ha sido ampliamente utilizada junto con la GF-AAS, ICP-AES e ICP-MS (Saint'pierre *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2005; de Jesus *et al.*, 2008, 2010; Lobo *et al.*, 2009, 2011; Silva *et al.*, 2010). Sin embargo, esta forma de preparación de muestra no siempre resulta adecuada para la determinación de todos los metales presentes en una muestra y, en el caso de utilizar un ICP, requiere de un gas auxiliar para estabilizar el plasma.

Chaves *et al.* (2008) utilizaron una microemulsión preparada a partir de una disolución de cesio con n-propanol al 5 % (m/v) y determinaron el contenido de Na y K en diferentes muestras de biodiesel preparadas a partir de diferentes tipos de aceites (soja, maíz y fritura) mediante F-AAS. De Jesus *et al.* (2008) utilizaron una microemulsión formada por 57,6 % (m/m) de n-pentanol, un 20 % (m/m) de biodiesel, un 14,4 % (m/m) de Triton X-100 y un 8 % (m/m) de una disolución acuosa de cloruro potásico diluida en HNO_3 para la determinación de Na y K mediante F-AAS en muestras de biodiesel preparadas a partir de aceite de soja.

Silva *et al.* (2010) emplearon una microemulsión más sencilla mezclando 2 g de biodiesel, 1 mL de una disolución acuosa de HNO_3 al 10 % (v/v) y n-propanol hasta el volumen final de 10 mL para determinar el contenido de Cd y Pb mediante GF-AAS. De Souza *et al.* (2008) determinaron simultáneamente la presencia de Ca, Fe, Mg, Mn, Na y P en muestras de

biodiesel mediante ICP-AES. La preparación de la muestra se realizó formando una emulsión constituida por 1 g de biodiesel, 0,6 g de Tritón X-100 como surfactante, 0,2 mL de HNO₃ concentrado y agua destilada hasta una masa final de 10 g.

También se han realizado estudios para la determinación del contenido de elementos metálicos en muestras de biodiesel sin necesidad de realizar mineralizaciones ni formación de emulsiones o microemulsiones. Así, por ejemplo, Ghisi *et al.* (2010) determinaron el contenido de Fe y Cu en muestras obtenidas a partir de aceite de fritura y de soja, mediante la disolución de las mismas con hidróxido de tetrametilamonio, calentamiento a 90 °C durante 5 minutos y análisis la mezcla resultante mediante GF-AAS.

Los elementos metálicos suelen estar presentes a muy bajas concentraciones en los biocombustibles, por lo que se requieren técnicas muy sensibles para su determinación. Las técnicas basadas en ICP son muy sensibles pero, como ya se ha comentado, la introducción de compuestos orgánicos en el plasma requiere una especial atención, ya que estos compuestos pueden desestabilizar o extinguir el plasma, debido a la elevada cantidad de materia orgánica presente en este tipo de muestras (Saint'Pierre *et al.*, 2002). Por esta razón es necesario incluir en el instrumento un módulo auxiliar de gas para la introducción controlada de oxígeno al gas de nebulización (Ar) y evitar así la formación de depósitos de carbono en la antorcha del plasma.

La espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) ha sido ampliamente utilizada para el análisis de metales en aceites vegetales, combustibles y biocombustibles, debido a su capacidad de análisis multielemental junto con su amplio rango lineal. Esta técnica se ha mostrado como muy adecuada para la determinación de un gran número de metales (mayoritarios y minoritarios) en muestras de biodiesel, previa digestión de la muestra en horno de microondas (Korn *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Iqbal *et al.*, 2010). La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) permite también la determinación multielemental, proporcionando menores límites de detección (Woods *et al.*, 2007). Esta técnica es muy adecuada para el análisis de trazas, si bien su mayor coste y mayor dificultad de operación hacen que el ICP-AES resulte más adecuado para la determinación de metales en aceites y biocombustibles.

Iqbal *et al.* (2010) realizaron una mineralización de muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de colza, por vía húmeda, en horno microondas empleando una mezcla de ácidos formada por HNO₃ y HCl (9:1, v/v), y aplicando una rampa de temperatura hasta 175 °C en 4,5 minutos y con un tiempo de mantenimiento de 4,5 minutos. Con este método de digestión se consiguió disolver las muestras de biodiesel y analizar 26 elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES, obteniendo resultados satisfactorios.

Korn *et al.* (2010) determinaron simultáneamente Na, K, Ca, Mg y P en muestras de biodiesel mediante ICP-AES. Para ello, aplicaron dos métodos de digestión: mineralización en vaso abierto mediante calentamiento convencional en un bloque calefactor y utilizando, en

varias etapas, una mezcla de HNO_3 , H_2SO_4 y H_2O_2 durante un tiempo total de 3 horas, y digestión ácida en horno de microondas con HNO_3 y H_2O_2 (7:1, v/v) durante 42 minutos. Según estos autores, aunque ambos métodos de digestión permitieron la obtención de resultados satisfactorios, la digestión en horno de microondas permite realizar el tratamiento de muestra en un menor tiempo y de una manera más segura, con un menor consumo de reactivos y una mayor precisión en los resultados obtenidos. Además, el procedimiento resultó ser más preciso que otros procesos descritos en la bibliografía debido a que, en este caso, no se utilizan disolventes orgánicos para la determinación de estos metales, como cuando se aplica la normativa europea.

VIII.2 Determinación del contenido de Na, K, Ca, Mg y P en muestras de aceite y biodiesel aplicando las normas UNE-EN 14107:2003 y UNE-EN 14538:2006

La determinación del contenido de sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo en las muestras de biodiesel objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral se realizó según las normas UNE-EN 14538:2006 *“Productos derivados de grasa y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de calcio, potasio, magnesio y sodio por análisis espectral de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP OES)”* y UNE-EN 14107:2003 *“Productos derivados de grasa y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de fósforo mediante espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivo (ICP)”*. Asimismo, estas mismas normas fueron aplicadas para el análisis de las muestras de aceite utilizadas como materias primas en la obtención de las distintas muestras de biodiesel, con objeto de comparar los contenidos de estos elementos metálicos tanto en la materia prima como en el producto final de la reacción de transesterificación por catálisis homogénea.

El empleo de la técnica ICP-AES para la determinación de los elementos metálicos establecidos en la normativa europea requiere la incorporación de un módulo auxiliar de oxígeno al espectrómetro de ICP-AES, el cual permite introducir en el plasma de argón una corriente de oxígeno, cuya función es evitar la formación de depósitos de carbono en la antorcha.

La determinación del contenido de sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo según la normativa europea en las muestras de aceite y biodiesel y los correspondientes blancos se realizó mediante ICP-AES bajo calibración convencional siguiendo el procedimiento experimental y las condiciones de operación instrumental (Tabla III.7) descritos en la sección III.4.5.1. Las muestras de biodiesel se prepararon según el procedimiento optimizado descrito en la sección III.4.2 de la presente Memoria, y los nombres y acrónimos empleados para las distintas muestras de aceite y biodiesel se muestran en la Tabla V.13.

Teniendo en cuenta que el contenido salino de las diluciones de las muestras de aceite y biodiesel y de los patrones de calibración puede ser distinto, se realizó la calibración con

patrón interno con objeto de compensar las posibles diferencias en la eficiencia de nebulización entre muestras y patrones.

La calibración con patrón interno (P.I.) se basa en la utilización del factor de respuesta relativo de cada punto a medir, con respecto a un marcador introducido como referencia. El procedimiento se lleva a cabo añadiendo tanto a muestras y blancos como a patrones de calibración una cantidad constante y conocida de un elemento que no esté presente en las muestras a analizar. En este estudio, se empleó itrio (Y) como patrón interno. El instrumento mide la señal del itrio a una longitud de onda de 371,030 nm, que debe ser constante. Cuando surgen diferencias en la señal del patrón interno (por ejemplo por diferencias en la eficiencia de nebulización, cambios de viscosidad, inestabilidad del plasma, deriva de la señal en análisis muy largos, etc.), el *software* de control del ICP-AES corrige el error y recalcula la concentración del resto de elementos analizados. Cuando se elige y se emplea un elemento como patrón interno de forma apropiada, se pueden compensar varios tipos de errores, tanto aleatorios como sistemáticos.

En las Tablas VIII.1 y VIII.2 se muestran los contenidos de sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo, determinados mediante ICP-AES según las normas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003, en las muestras de aceite y de biodiesel obtenidas a partir de ellas.

Tabla VIII.1.- Contenidos de Na, K, Ca, Mg y P, en mg kg⁻¹ (media ± desviación estándar, n=3), en muestras de aceite, determinados mediante ICP-AES según las normas UNE-EN 14107:2003 y UNE-EN 14538:2006.

Muestra de aceite	Ca (422,673 nm)	Mg (279,553 nm)	Na (588,995 nm)	K (769,896 nm)	P (213,618 nm)
AOL	0,78 ± 0,02	0,424 ± 0,005	0,635 ± 0,004	2,7 ± 0,1	0,39 ± 0,02
AOF	0,47 ± 0,02	0,511 ± 0,006	3,75 ± 0,04	4,34 ± 0,03	0,369 ± 0,005
AGL	0,104 ± 0,007	0,03122 ± 0,00005	0,84 ± 0,02	3,52 ± 0,07	0,652 ± 0,003
AGF	0,51 ± 0,01	0,60 ± 0,01	1,68 ± 0,03	2,51 ± 0,05	1,50 ± 0,01
ASL	0,08 ± 0,01	0,0113 ± 0,0004	0,83 ± 0,02	2,53 ± 0,05	3,93 ± 0,03
ASF	0,98 ± 0,02	5,55 ± 0,04	1,75 ± 0,02	2,84 ± 0,05	3,855 ± 0,003
ACL	0,21 ± 0,02	0,032 ± 0,001	0,953 ± 0,005	3,76 ± 0,02	0,469 ± 0,009
ACF	0,319 ± 0,009	0,568 ± 0,007	1,274 ± 0,001	2,88 ± 0,08	0,513 ± 0,006
AML	0,134 ± 0,009	0,0306 ± 0,0006	0,83 ± 0,02	3,2 ± 0,1	0,82 ± 0,02
AMF	0,39 ± 0,02	4,14 ± 0,04	2,26 ± 0,03	3,59 ± 0,09	0,55 ± 0,02
ASGL	0,196 ± 0,009	0,062 ± 0,004	0,88 ± 0,02	3,2 ± 0,1	0,270 ± 0,008
ASGF	0,055 ± 0,007	2,40 ± 0,02	1,65 ± 0,03	2,84 ± 0,05	0,253 ± 0,002
AOGF	0,03 ± 0,01	0,086 ± 0,001	1,26 ± 0,01	3,5 ± 0,1	1,910 ± 0,006
AOGMF	0,510 ± 0,007	0,40 ± 0,01	1,96 ± 0,04	3,11 ± 0,08	8,8 ± 0,1

Tabla VIII.2.- Contenidos de Na, K, Ca, Mg y P, en mg kg⁻¹ (media ± desviación estándar, n=3), en muestras de biodiesel, determinados mediante ICP-AES según las normas UNE-EN 14107:2003 y UNE-EN 14538:2006.

Muestra de biodiesel	Ca (422,673 nm)	Mg (279,553 nm)	Ca + Mg	Na (588,995 nm)	K (769,896 nm)	Na + K	P (213,618 nm)
BAOL	0,106 ± 0,004	0,030 ± 0,001	0,136 ± 0,004	0,687 ± 0,005	1,66 ± 0,02	2,35 ± 0,02	2,16 ± 0,02
BAOF	0,133 ± 0,002	0,0012 ± 0,0003	0,134 ± 0,002	1,03 ± 0,02	1,67 ± 0,02	2,70 ± 0,03	2,12 ± 0,05
BAGL	0,170 ± 0,004	0,0146 ± 0,0006	0,185 ± 0,004	2,84 ± 0,04	2,27 ± 0,07	5,11 ± 0,08	2,57 ± 0,03
BAGF	0,15 ± 0,01	0,017 ± 0,004	0,17 ± 0,01	1,136 ± 0,006	1,79 ± 0,02	2,93 ± 0,02	2,51 ± 0,04
BASL	0,136 ± 0,002	0,00778 ± 0,00009	0,144 ± 0,002	0,858 ± 0,007	1,64 ± 0,02	2,50 ± 0,02	2,43 ± 0,02
BASF	0,132 ± 0,003	0,006 ± 0,002	0,138 ± 0,003	0,770 ± 0,003	1,57 ± 0,02	2,34 ± 0,02	2,22 ± 0,02
BACL	0,168 ± 0,005	0,00176 ± 0,00002	0,170 ± 0,005	0,84 ± 0,01	1,980 ± 0,006	2,82 ± 0,01	2,25 ± 0,04
BACF	0,211 ± 0,008	0,0036 ± 0,0001	0,221 ± 0,008	1,15 ± 0,03	2,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,43 ± 0,02
BAML	0,173 ± 0,007	0,0050 ± 0,0007	0,178 ± 0,007	1,17 ± 0,02	2,42 ± 0,03	3,59 ± 0,04	2,29 ± 0,03
BAMF	0,27 ± 0,01	0,0041 ± 0,0005	0,2741 ± 0,01	2,50 ± 0,04	3,36 ± 0,05	5,86 ± 0,06	4,48 ± 0,09
BASGL	0,154 ± 0,009	0,00655 ± 0,00007	0,161 ± 0,009	1,298 ± 0,004	2,07 ± 0,02	3,37 ± 0,02	2,39 ± 0,02
BASGF	0,076 ± 0,006	0,0175 ± 0,0006	0,094 ± 0,006	3,32 ± 0,05	2,54 ± 0,04	5,86 ± 0,06	4,356 ± 0,002
BAOGF	0,17 ± 0,01	0,00162 ± 0,00008	0,17 ± 0,01	1,135 ± 0,007	2,13 ± 0,06	3,26 ± 0,06	2,29 ± 0,02
BAOGMF	0,21 ± 0,02	0,0044 ± 0,0003	0,21 ± 0,02	1,137 ± 0,009	2,37 ± 0,02	3,51 ± 0,02	3,08 ± 0,03

En la Tabla VIII.1, correspondiente a las muestras de aceite empleadas como materia prima para la obtención del biodiesel, se observa que los mayores contenidos de calcio y magnesio encontrados se corresponden con las muestras de aceite de semillas de fritura (0,98 y 5,55 mg kg⁻¹, respectivamente) y de oliva sin usar (0,78 y 0,424 mg kg⁻¹, respectivamente). Con respecto al sodio y potasio, los mayores contenidos se encontraron en las muestras de aceite de oliva de fritura (3,75 y 4,34 mg kg⁻¹, respectivamente) y de colza sin usar (0,953 y 3,76 mg kg⁻¹, respectivamente). Los mayores contenidos de fósforo se encontraron en las muestras de aceite de semillas sin usar y de fritura, con valores de 3,93 y 3,855 mg kg⁻¹, respectivamente. Cabe destacar el elevado contenido de fósforo hallado en la muestra de aceite de oliva-girasol-maíz de fritura (8,8 mg kg⁻¹), probablemente debido a una transferencia de este elemento desde los alimentos al aceite durante el proceso de fritura.

En general, se observa que el elemento mayoritario en las muestras de aceite analizadas es el potasio, con algunas excepciones para magnesio (ASF y AMF) y fósforo (ASL, ASF y AOGMF), seguido en la mayoría de los casos por el sodio. Los elementos minoritarios en las muestras analizadas suelen ser calcio y magnesio. Los contenidos de potasio presentaron valores comprendidos en el intervalo entre 2,53 y 3,76 mg kg⁻¹ para las muestras de aceite sin usar, mientras que para las muestras de aceite de fritura este intervalo aumentó a valores comprendidos entre 2,51 y 4,34 mg kg⁻¹. Asimismo, se observa que los contenidos de estos cinco elementos suele ser mayor, para un mismo tipo de aceite, para la muestra de fritura que para la muestra sin usar. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el proceso de fritura contribuye a un aumento en los contenidos de estos metales, ya sea mediante un proceso de concentración o por transferencia a partir de los alimentos.

Con respecto a las muestras de biodiesel (Tabla VIII.2), el biodiesel de aceite de maíz de fritura es el que presenta los mayores contenidos de calcio, potasio y fósforo (0,27, 3,36 y 4,48 mg kg⁻¹, respectivamente), mientras que el biodiesel de aceite de girasol de fritura es el que presenta el mayor contenido de magnesio (0,017 mg kg⁻¹) y el de aceite de soja-girasol de fritura es el que presenta el mayor contenido de sodio (3,32 mg kg⁻¹). En relación a las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite sin usar, el biodiesel de aceite de maíz sin usar es el que presenta el mayor contenido de calcio y potasio (0,173 y 2,42 mg kg⁻¹, respectivamente), mientras que el de aceite de girasol sin usar es el que presenta el mayor contenido de sodio y fósforo (2,84 y 2,57 mg kg⁻¹, respectivamente) y el mayor contenido de magnesio se encontró en el biodiesel de aceite de oliva sin usar (0,030 mg kg⁻¹).

En este caso, se observa que el elemento mayoritario es el fósforo, con la excepción del sodio para la muestra BAGL y del potasio para las muestras BACF y BAML, mientras que en las muestras de aceite el potasio era el elemento mayoritario. Esta variación en el contenido puede deberse a la posible introducción de fósforo en las muestras de biodiesel durante la etapa de lavado con agua acidulada con ácido fosfórico, al no eliminarse los restos de ácido con el posterior lavado con agua desionizada. Los elementos minoritarios son de nuevo calcio y magnesio, al igual que ocurre con las muestras de aceite.

Teniendo en cuenta los contenidos en los aceites de procedencia, se observa que el contenido de calcio disminuye en la mayoría de las muestras de biodiesel salvo en las muestras BAGL, BASL, BASF, BAML, BASGF y BAOGF en las que el contenido de este metal aumenta, mientras que el contenido de magnesio disminuye en todas las muestras analizadas, siendo esta disminución más pronunciada en el caso de las muestras de biodiesel de aceite de semillas de fritura, donde el contenido de magnesio disminuye de $5,55 \text{ mg kg}^{-1}$ en el aceite a $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$ en el biodiesel, y de aceite de maíz de fritura, donde disminuye de $4,14 \text{ mg kg}^{-1}$ en el aceite a $0,0041 \text{ mg kg}^{-1}$ en el biodiesel. En cuanto al contenido en sodio, se observa un aumento en las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de oliva, girasol, semillas, maíz y soja-girasol, así como maíz y soja-girasol de fritura. El contenido en potasio es, en todas las muestras de biodiesel, inferior o similar al de las muestras de aceite, mientras que el contenido en fósforo es superior en todas las muestras de biodiesel, con la excepción de las muestras BASL, BASF y BAOGMF.

Finalmente, la norma europea UNE-EN 14214:2009, relativa a la calidad del biodiesel en cuanto al contenido en elementos metálicos, establece que la suma del contenido de calcio y magnesio, por un lado, y de sodio y potasio, por el otro, no debe ser superior a 5 mg kg^{-1} , mientras que el contenido máximo de fósforo permitido es de 4 mg kg^{-1} . Como se puede apreciar en la Tabla VIII.2, todas las muestras de biodiesel verifican los límites máximos establecidos para Ca, Mg, Na y K, al igual que en el caso del fósforo, con la excepción de los biodiesel obtenidos a partir de aceite de maíz de fritura y de soja-girasol de fritura, cuyos contenidos de fósforo son ligeramente superiores al máximo establecido por la normativa europea, lo que parece sugerir la necesidad de mejoras en el proceso de evaporación del agua de lavado.

VIII.3 Determinación de elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES

En una segunda etapa del estudio, se determinaron los contenidos totales de los cinco elementos citados por la normativa europea, previa digestión ácida de las muestras en horno de microondas, ampliando el estudio a otros elementos metálicos y semimetálicos que pueden estar presentes tanto en la materia prima como en el producto de la reacción de transesterificación. De esta forma, el objetivo que se planteó fue la determinación, mediante la técnica ICP-AES, de 19 elementos (aluminio, arsénico, bario, calcio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, fósforo, plomo, vanadio y cinc) en las muestras de biodiesel objeto de estudio y en los aceites vegetales empleados como materias primas.

VIII.3.1 Selección de los parámetros instrumentales en ICP-AES

La técnica ICP-AES permite el análisis multielemental, con la consiguiente ventaja en relación al tiempo de análisis y la cantidad de resultados obtenidos. El equipo de ICP-AES empleado en el presente estudio opera en modo secuencial, por lo que la reducción del

tiempo de análisis es menor que en los instrumentos simultáneos, y esto obliga a trabajar con un menor número de líneas de emisión. Si bien, se consigue una importante reducción en el tiempo de análisis, frente a instrumentos monoelementales, como son los espectrofotómetros de absorción atómica, que requieren el ajuste del instrumento y la calibración para un solo analito en cada análisis. A pesar de las ventajas del empleo del ICP-AES, se trata de una técnica instrumental compleja, que requiere un estricto control de las condiciones de operación. La complejidad de la preparación de disoluciones patrón multielementales, el control de las posibles interferencias espectrales y de matriz, así como el propio estado del instrumento, implica la necesidad de un estudio pormenorizado de las distintas variables que intervienen en las condiciones del instrumento para obtener resultados fiables.

Entre los componentes instrumentales, el que más afecta a la sensibilidad del análisis es el sistema de nebulización. Lo más común es la introducción de muestras líquidas en el plasma en forma de aerosol, generado en un nebulizador neumático. El aerosol se forma al hacer confluír el caudal de muestra líquida con una corriente de gas a alta presión. El nebulizador va acoplado a una cámara de expansión, cuya función es condensar las gotas más grandes, evitando que alcancen el plasma y provoquen su extinción. En el presente estudio se disponía de dos tipos de nebulizadores neumáticos: de flujo concéntrico (Meinhard) y V-groove. El primero proporciona mejores límites de detección, de forma general, pero está formado por tubos concéntricos de vidrio, donde la muestra fluye por el tubo interno cuyo diámetro es de tan solo 300 μm , por lo que puede presentar problemas de obturación para el análisis de disoluciones con cantidad de sólidos disueltos superior a 0,1 %. En el nebulizador tipo V-groove, la muestra fluye por un surco en forma de V y confluye con el gas que surge de un orificio situado bajo el vértice del surco. Este tipo de nebulizadores son más adecuados para el análisis de muestras salinas, resultando más apropiado para el análisis de disoluciones procedentes de la digestión de muestras sólidas, ya que no suele presentar problemas de obturación. En el presente estudio se optó por el empleo de un nebulizador tipo V-groove. El resto de componentes instrumentales empleados se muestran en la sección III.2.

En cuanto a las condiciones instrumentales para el análisis por ICP-AES, los parámetros más críticos son los relacionados con el sistema de nebulización, es decir, los caudales de gas nebulizador y de introducción de muestra. Cuando se desea llevar a cabo el análisis de un solo elemento, la optimización se consigue registrando la señal de una disolución patrón que contenga el analito a distintos valores de estos parámetros. La operación se repite con una disolución de blanco, y se eligen las condiciones que proporcionen la mejor relación señal/ruido, calculada como la relación entre la señal debida sólo a la concentración de analito (es decir, la diferencia entre la señal del patrón y la señal del blanco) y la señal del blanco. En el caso de análisis multielemental, las condiciones se optimizaron empleando una disolución de ajuste que contenía 5,0 mg L^{-1} de manganeso y, por tanto, mediante la relación señal/ruido de este elemento. El instrumento de ICP-AES empleado permite controlar el caudal de gas de nebulización (argón) mediante la medida de su presión en kPa y el caudal de introducción de

muestra a través de los tubos de bomba peristáltica y la velocidad de la misma en rpm. Se seleccionaron una presión de gas de nebulización de 240 kPa (que proporciona caudales alrededor de 1 L min⁻¹) y una velocidad de bomba peristáltica de 40 rpm (aproximadamente 1 mL min⁻¹), ya que proporcionaban la mejor relación señal/ruido para la longitud de onda de 257,610 nm del Mn.

El resto de parámetros instrumentales pueden modificarse, si bien existen una serie de directrices recomendadas por la casa comercial para conseguir el funcionamiento óptimo del instrumento. Entre estos parámetros se encuentran:

- La potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma para su generación y mantenimiento. El instrumento dispone de un generador de radiofrecuencia de 40,68 MHz, que permite trabajar a potencias de radiofrecuencia entre 1-2 kW. En principio, un valor de 1200 W es suficiente para la ionización de la mayoría de los elementos, siendo conveniente emplear la menor potencia posible para evitar forzar el sistema y sus componentes. Tan solo se recomienda trabajar a potencias mayores cuando se analizan elementos con elevado potencial de ionización (como el selenio) o con muestras que contienen disolventes orgánicos, ya que absorben parte de la potencia aplicada provocando distorsiones en el plasma y fluctuaciones en las señales obtenidas. Al aplicar la normativa europea para la determinación de Na, K, Ca, Mg y P, los análisis se realizaron en medio orgánico, por lo que fue necesario aumentar la potencia de radiofrecuencia.

- El voltaje del fotomultiplicador, que puede variarse entre 650 y 750 V. Lo habitual es trabajar a 650 V y aumentarlo a medida que se produzca el desgaste del detector, lo que se puede detectar a través de la disminución de la señal para la disolución de ajuste del instrumento (5,0 mg L⁻¹ de manganeso).

- Los caudales de gas argón de enfriamiento y auxiliar, que son los responsables de la formación y mantenimiento del plasma, así como de la refrigeración de la antorcha de cuarzo, que se encuentra a temperaturas entre 8.000-10.000 K. Apenas afectan a la señal de analito, por lo que se recomienda mantenerlos a 15,0 y 1,5 L min⁻¹, respectivamente.

Al margen de los parámetros instrumentales anteriormente mencionados, se deben realizar una serie de operaciones previas al análisis que permitan el ajuste del instrumento de ICP-AES. Es importante calibrar el sistema selector de longitudes de onda, lo que se realiza mediante la monitorización de la señal emitida por una lámpara de mercurio que lleva incorporado el instrumento. Cuando la lámpara emite, lo hace a las doce longitudes de onda del mercurio comprendidas entre 164,993 y 546,074 nm, de modo que permite que el sistema se autocalibre y reajuste si es necesario. La operación de calibración de las longitudes de onda proporciona un informe que permite detectar problemas que pueden proceder del deterioro del sistema monocromador o de la propia lámpara de mercurio.

Otra operación que debe realizarse cada vez que se enciende el plasma, es el ajuste de la sensibilidad del espectrómetro de emisión ICP-AES. El proceso se realiza aspirando la

disolución de ajuste mientras se ajusta la posición de la antorcha. En realidad la antorcha no se mueve, sino que lo hacen unos espejos situados a la entrada del monocromador, que permiten mejorar la captación de energía emitida por los iones excitados en el plasma. El registro diario de este parámetro permite detectar cambios de sensibilidad que pueden estar relacionados con el desgaste del detector.

VIII.3.2 Estudio de las características analíticas en ICP-AES

Una vez ajustado el espectrómetro, se estudiaron las características analíticas para la determinación de los metales seleccionados: aluminio, arsénico, bario, calcio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, fósforo, plomo, vanadio y cinc. Con objeto de reducir el número de líneas de emisión analizadas, ya que como se ha comentado el ICP-AES trabaja en modo secuencial y por lo tanto un mayor número de líneas conduce a un mayor tiempo de análisis, se seleccionó una longitud de onda para cada elemento, en base a las características analíticas en lo que a sensibilidad, especialmente para los elementos minoritarios, y selectividad, para evitar en lo posible las interferencias espectrales, se refiere.

En la Tabla VIII.3 se muestran los parámetros de calibración del método (pendientes de calibración, ordenadas en el origen y los correspondientes intervalos de confianza), los coeficientes de correlación (r), así como los valores del error estándar de la estimación ($S_{y/x}$) y las características analíticas para la determinación de los elementos estudiados. Estos parámetros proceden de calibrados realizados con cinco disoluciones patrón de diferente concentración para cada analito, según los intervalos de concentración mostrados en la Tabla III.10 de la sección III.4.5.2. El límite de detección (LD) representa la mínima concentración de elemento que puede ser diferenciada del blanco, mientras que el límite de cuantificación (LQ) representa la mínima concentración de analito que puede ser realmente cuantificada. Ambos parámetros han sido calculados siguiendo la normativa IUPAC, como tres y diez veces, para el LD y el LQ, respectivamente, la desviación típica de diez medidas de la señal del blanco. La precisión, en términos de porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD), fue evaluada a partir de tres medidas de una disolución patrón, calculado para una concentración de Al, As, Ca, K, Mg, Ni y V de $500 \mu\text{g L}^{-1}$; de Pb, Cu, Fe, Na y P de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ y de Ba, Cd, Co, Cr, Mn, Mo y Zn de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Los estudios se realizaron bajo las condiciones de operación instrumental recogidas en la Tabla III.9 de la sección III.4.5.2.

Tabla VIII.3.- Datos de calibración y características analíticas para la determinación de elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES.

Elemento	λ (nm)	$(b \pm S_b^*) \cdot 10^2$ (cps L μg^{-1})	$a \pm S_a^*$ (cps)	$S_{y/x}$	r	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% RSD
Aluminio	396,152	2,16 \pm 0,02	4,7 \pm 0,3	0,1463	0,99977	0,42	1,39	3,8
Arsénico	193,696	0,13 \pm 0,003	1,0 \pm 0,2	0,1205	0,99901	0,46	1,55	4,6
Bario	455,403	126 \pm 1	6,9 \pm 0,6	0,0159	0,99987	0,007	0,02	0,5
Calcio	317,933	1,725 \pm 0,008	16 \pm 1	0,0542	0,99995	0,37	1,25	3,6
Cadmio	226,502	6,35 \pm 0,04	0,19 \pm 0,06	0,0211	0,99994	0,009	0,03	0,6
Cobalto	228,616	2,77 \pm 0,02	0,23 \pm 0,08	0,1143	0,99985	0,03	0,11	2,8
Cromo	267,716	2,10 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	0,1211	0,99972	0,03	0,11	3,0
Cobre	324,754	2,34 \pm 0,04	0,15 \pm 0,04	0,0205	0,99953	0,12	0,40	3,9
Hierro	238,204	1,74 \pm 0,02	0,8 \pm 0,2	0,1483	0,99965	0,08	0,28	3,6
Potasio	766,490	0,952 \pm 0,008	0,11 \pm 0,08	0,1407	0,99985	0,26	0,87	2,4
Magnesio	279,806	0,385 \pm 0,005	0,20 \pm 0,07	0,1118	0,99971	0,27	0,91	2,8
Manganeso	257,610	13,6 \pm 0,2	4 \pm 1	0,1915	0,99959	0,009	0,03	0,6
Molibdeno	202,030	1,53 \pm 0,02	0,25 \pm 0,08	0,1855	0,99951	0,04	0,15	3,5
Sodio	589,592	11,2 \pm 0,1	61 \pm 2	0,0165	0,99970	0,13	0,42	4,2
Níquel	352,454	0,595 \pm 0,009	0,4 \pm 0,1	0,1824	0,99955	0,44	1,48	4,5
Fósforo	213,618	0,2459 \pm 0,0007	0,11 \pm 0,02	0,0232	0,99998	0,20	0,66	4,4
Plomo	220,353	0,50 \pm 0,02	0,5 \pm 0,1	0,1906	0,99792	0,23	0,78	4,5
Vanadio	292,402	0,588 \pm 0,006	0,10 \pm 0,03	0,1522	0,99978	0,25	0,84	2,1
Cinc	206,200	4,9 \pm 0,1	4,0 \pm 0,3	0,0253	0,99840	0,05	0,16	3,8

*Intervalos de confianza (S_a y S_b) calculados al 95 % de nivel de confianza.

Como se puede observar en esta tabla, los resultados obtenidos para todos los elementos analizados muestran buena linealidad en el rango de concentraciones estudiado con coeficientes de correlación superiores a 0,9979. Los LD, LQ y la pendiente de la recta de calibrado permiten establecer la sensibilidad de las diferentes líneas de emisión estudiadas. Por otro lado, se observa que los límites de detección obtenidos para los diferentes elementos se encontraron entre $0,007 \mu\text{g g}^{-1}$ para el bario y $0,46 \mu\text{g g}^{-1}$ para el arsénico mientras que los límites de cuantificación del método oscilaron entre $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ para el bario y $1,55 \mu\text{g g}^{-1}$ para el arsénico. Estos parámetros indican la validez de la técnica para poder determinar y cuantificar los distintos metales presentes en muestras de aceite y biodiesel. Los % RSD fueron inferiores al 5 % para todos los elementos estudiados, lo que pone de manifiesto un elevado grado de precisión en la determinación de elementos metálicos y semimetálicos por ICP-AES.

VIII.4 Desarrollo de un método analítico para la determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel

VIII.4.1 Optimización del método de digestión en horno de microondas

Con objeto de seleccionar el método más adecuado para la mineralización de las muestras de aceite y biodiesel mediante horno de microondas, se realizaron una serie de estudios de optimización sobre la muestra de aceite de girasol sin usar y la muestra de biodiesel correspondiente.

Inicialmente, se optimizó la cantidad de muestra a digerir, realizando diferentes digestiones ácidas con 10 mL de ácido nítrico concentrado en las que se emplearon desde 0,1 g a 0,3 g de muestra, tanto de aceite como de biodiesel, teniendo en cuenta las recomendaciones de la casa comercial. El interés de este estudio radica en que mediante la mineralización en horno de microondas de elevadas cantidades de muestra con gran contenido de matriz orgánica, como es el caso de las muestras de aceite y biodiesel, se pueden originar elevadas presiones durante el proceso de digestión, con el consiguiente riesgo en cuanto a la seguridad del procedimiento (el instrumento consta de una sonda de presión que aborta automáticamente el método de digestión cuando se supera la presión máxima establecida, la cual viene dada por las especificaciones de los vasos empleados).

Por tanto, es necesario llegar a una situación de compromiso en la que la seguridad esté garantizada durante la digestión y que la cantidad de muestra sea suficiente para determinar los elementos minoritarios o traza. La casa comercial recomienda mineralizar una cantidad de muestra no superior a 0,3 g, por lo que se estudió la digestión de 0,1, 0,2 y 0,3 g de muestra. Estos estudios mostraron que el empleo de 0,3 g de muestra, máxima cantidad recomendada, no suponía ningún riesgo para la seguridad del procedimiento, a la vez que proporcionaba los mejores resultados, por lo que se decidió emplear esta cantidad de muestra para las sucesivas mineralizaciones.

Una vez establecida la cantidad de muestra a digerir, se ensayaron tres procedimientos basados en la digestión ácida con calentamiento en horno de microondas, empleando como medios de mineralización:

- Ácido nítrico concentrado (10 mL)
- Una mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en proporción 4:1 (v/v) (10 y 12 mL)
- Agua regia (mezcla de ácido clorhídrico y ácido nítrico, en proporción 3:1 (v/v) (10 mL)

El programa de temperatura aplicado con el horno microondas fue el mismo en los tres casos estudiados y se muestra en la Tabla III.8 de la sección III.4.5.2. El empleo de la mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en proporción 4:1 (v/v), requiere una etapa de pre-digestión a temperatura ambiente, durante aproximadamente 30 minutos, con objeto de evitar un aumento descontrolado de la presión en el interior de los vasos de microondas durante el proceso de digestión, debido a la liberación de hidrógeno. Esta sobrepresión puede ocasionar que la sonda de presión del horno de microondas aborte el método antes de que finalice el proceso de mineralización.

Durante la etapa de tratamiento de muestra, es necesario evitar cualquier pérdida y/o contaminación de analito, lo que es especialmente complicado cuando el tratamiento de la muestra implica la destrucción de la matriz orgánica, ya que la mineralización suele ser la etapa más larga y tediosa del análisis y en la que se pueden cometer más errores, como pueden ser pérdidas de analito por volatilización o contaminación de muestras y blancos, respectivamente, con el consiguiente error e imprecisión de los resultados obtenidos y aumento de los límites de detección y cuantificación. Estos problemas se ven acentuados en la determinación a nivel de trazas.

Para evitar posibles contaminaciones, todo el material de vidrio se lavó varias veces con agua desionizada y se mantuvo en una disolución de ácido nítrico al 50 % (v/v) durante 24 horas para eliminar las trazas metálicas. A continuación, se lavó de nuevo con agua desionizada y se mantuvo en una disolución de ácido clorhídrico al 5 % (v/v) durante 24 horas para eliminar las trazas orgánicas. Finalmente, se lavó con agua desionizada. Al igual que cuando se empleó la normativa europea para la determinación de metales y teniendo en cuenta que el contenido salino de las disoluciones obtenidas mediante la mineralización de las muestras de aceite y biodiesel y de los patrones de calibración puede ser distinto, se aplicó el método de calibración con patrón interno, con objeto de compensar las posibles diferencias en la eficiencia de nebulización entre muestras y patrones.

En todos los métodos de digestión anteriormente citados, se prepararon, además de las muestras de aceite y biodiesel, los correspondientes blancos, que fueron analizados mediante ICP-AES bajo calibración convencional, según el procedimiento descrito en la sección III.4.5.2. Las muestras digeridas y los correspondientes blancos se diluyeron con agua

desionizada hasta 25 mL, se añadió la cantidad correspondiente de itrio, como patrón interno, para tener una concentración final de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, se guardaron en frascos de polipropileno y se conservaron en el frigorífico en ausencia de luz a $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

En la Tabla VIII.4 se presentan los resultados obtenidos mediante calibración convencional con patrón interno, para la digestión de la muestra de aceite de girasol sin usar y la muestra de biodiesel correspondiente con 10 mL de ácido nítrico concentrado y con 10 mL de la mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en proporción 4:1 (v/v). Los resultados obtenidos con 12 mL de la mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en proporción 4:1 (v/v), y con 10 mL de agua regia proporcionaron unos resultados sujetos a una mayor incertidumbre, por lo que se desearon para futuras experiencias. En el caso de la digestión con 12 mL de la mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en proporción 4:1 (v/v), los contenidos metálicos conseguidos con esta mezcla ácida fueron similares a los obtenidos con un volumen de 10 mL de la misma mezcla, es decir, que el aumento de la cantidad de agentes oxidantes no mejoraba los resultados, por lo que su empleo se descartó para futuras experiencias. Al utilizar agua regia se observó la formación de un producto amarillento de naturaleza desconocida en las paredes de los vasos de digestión, el cual era muy difícil de eliminar, requiriendo varias etapas de lavados con ácido nítrico, por lo que también se descartó su empleo como mezcla oxidante para la digestión de las muestras de aceite y biodiesel.

Tabla VIII.4.- Contenidos totales, expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, n=3), de los elementos analizados mediante ICP-AES en la muestra de aceite de girasol sin usar y biodiesel de aceite de girasol sin usar, empleando dos medios de mineralización en horno de microondas.

Elemento	λ (nm)	Aceite de girasol sin usar		Biodiesel de aceite de girasol sin usar	
		HNO ₃	HNO ₃ -H ₂ O ₂ (4:1, v/v)	HNO ₃	HNO ₃ -H ₂ O ₂ (4:1, v/v)
Aluminio	396,152	<LQ	<LQ	3 \pm 1	2,39 \pm 0,04
Arsénico	193,696	<LQ	<LQ	<LQ	2,9 \pm 0,1
Bario	455,403	<LQ	<LQ	0,041 \pm 0,004	0,072 \pm 0,001
Calcio	317,933	4,6 \pm 0,6	9,4 \pm 0,5	31 \pm 3	33,3 \pm 0,1
Cadmio	226,502	<LQ	0,030 \pm 0,002	<LQ	0,094 \pm 0,002
Cobalto	228,616	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cromo	267,716	<LQ	<LQ	<LQ	0,13 \pm 0,01
Cobre	324,754	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Hierro	238,204	0,35 \pm 0,05	0,50 \pm 0,06	6 \pm 1	5,6 \pm 0,4
Potasio	766,490	6,3 \pm 0,5	7,4 \pm 0,2	3 \pm 1	2,9 \pm 0,1
Magnesio	279,806	<LQ	2,7 \pm 0,1	<LQ	<LQ
Manganeso	257,610	0,071 \pm 0,006	0,19 \pm 0,01	<LQ	0,040 \pm 0,004
Molibdeno	202,030	<LQ	0,17 \pm 0,02	<LQ	<LQ
Sodio	589,592	19 \pm 2	26,2 \pm 0,5	4 \pm 1	3,86 \pm 0,07
Níquel	352,454	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Fósforo	213,618	5,7 \pm 0,6	11,3 \pm 0,7	7,4 \pm 0,8	16,2 \pm 0,4
Plomo	220,353	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Vanadio	292,402	<LQ	<LQ	0,9 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2
Cinc	206,200	0,46 \pm 0,05	0,66 \pm 0,04	1,8 \pm 0,3	3,1 \pm 0,4

Como se observa en la Tabla VIII.4, se obtuvieron resultados similares con ambos procesos de mineralización para la mayoría de los elementos analizados, tanto en la muestra de aceite como en la de biodiesel. En general, se observó una mayor reproducibilidad entre réplicas al emplear la mezcla $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (4:1, v/v), lo que se traduce en una desviación estándar inferior, por lo que se decidió emplear ésta como mezcla oxidante para llevar a cabo la digestión del resto de muestras de aceite y biodiesel estudiadas.

En conclusión, los mejores resultados para la determinación de los elementos metálicos y semimetálicos estudiados se obtuvieron al mineralizar las muestras de aceite y biodiesel en horno microondas, a una temperatura máxima de 200 °C y un tiempo de mantenimiento de 15 minutos, empleando 10 mL de $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (4:1, v/v) como mezcla de digestión y una cantidad de muestra de, aproximadamente, 0,3 g.

VIII.4.2 Validación del método analítico optimizado para la determinación de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel

En cualquier método analítico es importante evaluar la posible alteración de los analitos durante cualquier etapa del proceso de tratamiento de muestra. Para ello, lo más adecuado es disponer de materiales de referencia certificados en los elementos estudiados, que presenten una matriz similar a la de las muestras analizadas. Sin embargo, la ausencia de este tipo de materiales de referencia, dado que en la actualidad no existen en el mercado muestras de aceite y biodiesel cuyo contenido metálico esté certificado, hizo necesario realizar estos estudios con muestras de aceite y biodiesel enriquecidas con disoluciones patrón certificadas de los distintos elementos analizados.

De esta forma, se realizó un estudio de recuperación de los elementos estudiados sobre las muestras de aceite y biodiesel enriquecidas (aceite de girasol sin usar y biodiesel obtenido a partir de ella). El porcentaje de recuperación se evaluó de forma indirecta, añadiendo cantidades exactamente conocidas del elemento a determinar a una muestra previamente analizada, según la siguiente ecuación:

$$R (\%) = \frac{X_2 - X_1}{X_{\text{añadida}}} \cdot 100$$

donde:

- X_2 : cantidad total de cada elemento encontrada en la muestra enriquecida.
- X_1 : cantidad total de cada elemento encontrada en la muestra sin enriquecer.
- $X_{\text{añadida}}$: cantidad de cada elemento añadida a la muestra.

Los ensayos de recuperación se llevaron a cabo tras la adición de disoluciones patrón de los 19 elementos estudiados sobre la muestra de aceite y biodiesel, respectivamente, realizándose el enriquecimiento a dos niveles de concentración (aproximadamente el doble y

el cuádruple de la concentración de cada elemento metálico encontrado en cada muestra). En las Tablas VIII.5 y VIII.6 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras de aceite y biodiesel, respectivamente, a los dos niveles de concentración estudiados, junto con los % RSD obtenidos.

Tabla VIII.5.- Porcentajes medios de recuperación de los elementos estudiados (n = 4), adicionados a dos niveles de concentración (doble y cuádruple), sobre la muestra de aceite de girasol sin usar, una vez sometida al proceso de mineralización en horno de microondas optimizado, y % RSD obtenidos.

Elemento	Enriquecimiento doble		Enriquecimiento cuádruple	
	Recuperación (%)	% RSD	Recuperación (%)	% RSD
Aluminio	98,2	1,9	99,1	1,5
Arsénico	99,4	2,2	102,3	1,8
Bario	99,9	2,5	98,4	2,0
Calcio	102,3	1,8	104,8	2,4
Cadmio	97,9	2,0	98,7	2,1
Cobalto	99,2	2,4	100,2	1,6
Cromo	99,9	2,1	101,6	2,3
Cobre	103,4	2,4	102,4	2,4
Hierro	99,6	1,0	100,9	1,0
Potasio	105,2	1,3	104,9	1,3
Magnesio	104,5	1,0	103,6	1,0
Manganeso	101,2	1,9	99,8	1,9
Molibdeno	99,2	2,5	99,9	2,1
Sodio	105,6	2,2	104,7	2,2
Níquel	102,4	1,9	101,2	2,4
Fósforo	103,4	1,5	100,6	1,5
Plomo	99,6	1,9	99,4	1,3
Vanadio	99,1	1,6	99,9	1,2
Cinc	98,9	2,4	98,9	1,9

Tabla VIII.6.- Porcentajes medios de recuperación de los elementos estudiado (n = 4), adicionados a dos niveles de concentración (doble y cuádruple), sobre la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de girasol sin usar, una vez sometida al proceso de mineralización en horno de microondas optimizado, y % RSD obtenidos.

Elemento	Enriquecimiento doble		Enriquecimiento cuádruple	
	Recuperación (%)	% RSD	Recuperación (%)	% RSD
Aluminio	99,5	1,0	101,2	1,5
Arsénico	98,2	1,3	100,1	1,8
Bario	98,6	1,0	99,9	2,0
Calcio	104,2	1,9	103,2	2,4
Cadmio	99,6	2,6	101,2	2,1
Cobalto	100,2	2,2	99,1	1,6
Cromo	102,7	1,9	103,5	2,3
Cobre	97,6	2,2	98,2	2,1
Hierro	105,7	2,4	100,5	2,6
Potasio	103,6	1,5	102,4	2,9
Magnesio	100,1	1,3	99,8	1,2
Manganeso	97,8	1,2	100,1	1,9
Molibdeno	99,4	1,5	101,2	1,6
Sodio	101,2	1,8	99,6	2,9
Níquel	103,4	2,0	98,7	3,4
Fósforo	104,6	2,4	102,4	3,6
Plomo	100,1	2,1	99,6	1,9
Vanadio	101,2	1,6	98,7	1,6
Cinc	103,2	2,3	100,6	1,4

Como se observa en las Tablas VIII.5 y VIII.6, las recuperaciones obtenidas para la muestra de aceite estaban comprendidas entre 97,9 % para el cadmio y 105,6 % para el sodio, con % RSD inferiores a 2,5 % para el nivel bajo de enriquecimiento y comprendidas entre 98,4 % para el bario y 104,9 % para el potasio con % RSD inferiores a 2,4 % para el nivel alto de enriquecimiento. En el caso de la muestra de biodiesel, las recuperaciones, para el nivel bajo de enriquecimiento, estaban comprendidas entre 97,8 % para el manganeso y 105,7 % para el hierro, con % RSD inferiores a 2,6 %, mientras que para el nivel alto de enriquecimiento las recuperaciones estaban comprendidas entre 98,2 % para el cobre y 103,5 % para el cromo, con % RSD inferiores a 3,6 %.

De esta forma, se puede concluir que los elementos estudiados no sufren alteraciones durante el proceso de digestión en horno de microondas optimizado y en presencia de la matriz estudiada, no sufriendo modificación alguna ni produciéndose pérdidas o transformaciones de los elementos, obteniéndose recuperaciones cuantitativas para todos los analitos. A partir de estos resultados, se puede afirmar que el método de tratamiento de muestra desarrollado es reproducible bajo las condiciones señaladas.

VIII.4.3 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite y biodiesel

El proceso de digestión en horno de microondas optimizado fue aplicado al resto de muestras de aceite y de biodiesel, como etapa previa a la determinación de elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES.

VIII.4.3.1 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de aceite

Entre los elementos analizados en las muestras de aceite, sólo se ha encontrado normativa sobre las concentraciones máximas permitidas en aceites de consumo humano para el hierro, cobre, plomo y arsénico. De esta forma, según el Real Decreto 308/1983, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria española de aceites vegetales, las cantidades máximas permitidas de hierro, cobre, plomo y arsénico son 10; 0,4; 0,1 y 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Por otro lado, la Comisión del *Codex Alimentarius* ha establecido concentraciones máximas permitidas para Fe y Cu (criterios de calidad para oligoelementos metálicos), así como para Pb y As (contaminantes), en las normas para aceites de oliva y aceites de orujo de aceituna (CODEX STAN 33-1981), aceites vegetales especificados (CODEX STAN 210-1999) y grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales (CODEX STAN 19-1981). De igual forma, las Normas Comerciales aplicables al aceite de oliva y al aceite de orujo de oliva, aprobadas por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2006, 2008), adoptan las mismas concentraciones máximas de la norma CODEX STAN 33-1981. Las concentraciones máximas permitidas para estos elementos por las diferentes normas están recogidas en la Tabla VIII.7.

Tabla VIII.7.- Concentraciones máximas permitidas, en $\mu\text{g g}^{-1}$, de hierro, cobre, plomo y arsénico según las normas del CODEX y del COI.

Elemento	COI 2006, 2008	CODEX STAN 33-1981	CODEX STAN 210-1999	CODEX STAN 19-1981
Hierro	3	3	1,5 - 5,0	2,5 - 5,0
Cobre	0,1	0,1	0,1 - 0,4	0,1 - 0,4
Plomo	0,1	0,1	0,1	0,1
Arsénico	0,1	0,1	0,1	0,1

La concentración máxima permitida de Pb y As es 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, independientemente del tipo de aceite, mientras que la de Fe y Cu varía en función de la norma. De esta forma, para aceites de oliva y de orujo de aceituna, las concentraciones máximas permitidas son 3 y 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, mientras que para el resto de aceites las concentraciones varían en función de si el aceite es refinado o virgen. Así, para los aceites de colza, girasol, maíz y soja la concentración máxima permitida de Fe varía entre 1,5 y 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, y la de Cu entre 0,1 y 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los contenidos totales de los elementos metálicos y semimetálicos obtenidos para las diferentes muestras de aceite analizadas se recogen en la Tabla VIII.8.

Tabla VIII.8.- Contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos, en $\mu\text{g g}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, n=3), analizados por ICP-AES en muestras de aceite, previa mineralización en horno de microondas.

Muestra de aceite	Al	As	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
AOL	2,21 \pm 0,03	<LQ	0,095 \pm 0,004	51 \pm 1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,2 \pm 0,3
AOF	<LQ	<LQ	0,16 \pm 0,01	39,2 \pm 0,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,46 \pm 0,02
AGF	<LQ	<LQ	<LQ	5,3 \pm 0,9	0,038 \pm 0,002	<LQ	<LQ	<LQ	0,31 \pm 0,06
ASL	<LQ	<LQ	0,39 \pm 0,01	12,4 \pm 0,2	0,040 \pm 0,003	<LQ	<LQ	<LQ	0,57 \pm 0,03
ASF	<LQ	<LQ	0,23 \pm 0,01	6,4 \pm 0,3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,62 \pm 0,02
ACL	1,3 \pm 0,1	<LQ	0,020 \pm 0,002	8,8 \pm 0,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,36 \pm 0,02
ACF	1,2 \pm 0,3	<LQ	0,084 \pm 0,002	26 \pm 1	0,025 \pm 0,001	<LQ	0,42 \pm 0,02	<LQ	3,2 \pm 0,1
AML	1,7 \pm 0,2	<LQ	0,50 \pm 0,04	91 \pm 5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,67 \pm 0,03
AMF	1,4 \pm 0,1	<LQ	0,096 \pm 0,002	39,3 \pm 0,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,46 \pm 0,03
ASGL	<LQ	<LQ	0,20 \pm 0,03	30 \pm 2	0,023 \pm 0,01	<LQ	0,31 \pm 0,02	<LQ	0,79 \pm 0,02
ASGF	1,6 \pm 0,1	<LQ	0,12 \pm 0,02	7,9 \pm 0,4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,2 \pm 0,2
AOGF	<LQ	<LQ	0,23 \pm 0,01	55 \pm 3	0,043 \pm 0,03	<LQ	<LQ	<LQ	0,41 \pm 0,01
AOGMF	<LQ	<LQ	0,088 \pm 0,006	89 \pm 3	0,037 \pm 0,002	<LQ	<LQ	<LQ	8,7 \pm 0,3

Cont. Tabla VIII.8.- Contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos, en $\mu\text{g g}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, n=3), analizados por ICP-AES en muestras de aceite, previa mineralización en horno de microondas.

Muestra de aceite	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P	Pb	V	Zn
AOL	6,6 \pm 0,2	2,8 \pm 0,2	0,19 \pm 0,01	<LQ	2,6 \pm 0,5	<LQ	7,5 \pm 0,6	<LQ	<LQ	3,1 \pm 0,5
AOF	9,4 \pm 0,5	3,9 \pm 0,3	0,16 \pm 0,04	0,42 \pm 0,01	11,3 \pm 0,8	<LQ	15,8 \pm 0,8	<LQ	<LQ	2,9 \pm 0,1
AGF	6,0 \pm 0,2	4,3 \pm 0,3	0,20 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	4,9 \pm 0,7	<LQ	6,3 \pm 0,3	<LQ	<LQ	0,67 \pm 0,03
ASL	8,4 \pm 0,1	<LQ	0,19 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	1,6 \pm 0,3	<LQ	8,2 \pm 0,3	<LQ	<LQ	5,2 \pm 0,2
ASF	7,7 \pm 0,2	15,4 \pm 0,5	0,19 \pm 0,01	0,36 \pm 0,03	3,0 \pm 0,7	<LQ	18 \pm 1	<LQ	<LQ	1,4 \pm 0,4
ACL	8,2 \pm 0,3	<LQ	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,04	28 \pm 4	<LQ	41 \pm 3	<LQ	<LQ	1,9 \pm 0,3
ACF	9,8 \pm 0,5	3,6 \pm 0,3	0,19 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	155 \pm 7	<LQ	15,1 \pm 0,6	<LQ	<LQ	0,81 \pm 0,06
AML	6,4 \pm 0,3	<LQ	0,26 \pm 0,02	<LQ	5,7 \pm 0,5	<LQ	9,1 \pm 0,6	<LQ	<LQ	5,2 \pm 0,4
AMF	3,8 \pm 0,1	13,5 \pm 0,4	0,20 \pm 0,01	<LQ	4,0 \pm 0,3	<LQ	13,7 \pm 0,8	<LQ	<LQ	1,2 \pm 0,3
ASGL	4,9 \pm 0,3	<LQ	0,22 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	7,8 \pm 0,8	<LQ	9 \pm 1	<LQ	<LQ	2,9 \pm 0,3
ASGF	5,4 \pm 0,1	8,3 \pm 0,5	0,21 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	6,5 \pm 0,1	<LQ	13 \pm 1	<LQ	<LQ	1,4 \pm 0,2
AOGF	6,3 \pm 0,2	3,4 \pm 0,1	0,23 \pm 0,01	<LQ	5,2 \pm 0,5	<LQ	4,5 \pm 0,3	<LQ	<LQ	4,2 \pm 0,2
AOGMF	5,2 \pm 0,4	2,6 \pm 0,2	0,21 \pm 0,01	<LQ	5,1 \pm 0,7	<LQ	9,6 \pm 0,5	<LQ	<LQ	8,7 \pm 0,6

Como se puede apreciar en la Tabla VIII.8, los resultados obtenidos mostraron contenidos de arsénico, cobalto, cobre, níquel, plomo y vanadio por debajo del límite de cuantificación del método para todas las muestras de aceite analizadas, que son, respectivamente, 1,5; 0,1; 0,4; 1,5; 0,8 y 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$. En relación a los elementos cuyo contenido se encuentra legislado (Tabla VIII.7), se observa que las muestras de aceite sin usar cumplen las mencionadas normativas en cuanto al contenido de hierro. En cambio, no todas las muestras de aceite de fritura la cumplen, al superar el valor mínimo establecido en las normas del *Codex Alimentarius* y del COI para este elemento metálico, aunque si verificaría la normativa española vigente. Con respecto al arsénico, cobre y plomo, la técnica empleada no permitiría verificar que los aceites cumplen las normativas citadas, debido a que los límites de cuantificación del método son superiores a las concentraciones máximas permitidas.

Según la bibliografía, los contenidos de cobre, níquel, cobalto y plomo son muy variables en función del tipo de aceite vegetal, e incluso en función de la procedencia y la zona donde se cultiva el tipo de aceituna con la que se produce el aceite de oliva. De esta forma, Cindric *et al.* (2007) encontraron contenidos de cobre entre 0,04 y 0,56 $\mu\text{g g}^{-1}$, de níquel entre 0,08 y 0,30 $\mu\text{g g}^{-1}$, de cobalto entre 0,01 y 1,13 $\mu\text{g g}^{-1}$ y los contenidos de plomo fueron inferiores al límite de detección del método, para los distintos tipos de aceites estudiados (oliva, girasol, sésamo, arroz y soja). Por el contrario, Zeiner *et al.* (2005) encontraron contenidos de 0,13-2,26 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el níquel, 0,08-1,10 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el cobre y 0,005-5,45 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el cobalto, en su estudio con diferentes tipos de aceites de oliva, estando de nuevo el plomo por debajo del límite de detección del método. Matos Reyes *et al.* (2006) determinaron elevados contenidos de níquel (aproximadamente 4,5 $\mu\text{g g}^{-1}$) y cobre (aproximadamente 3,6 $\mu\text{g g}^{-1}$) en aceite de soja y de maíz. Por otro lado, Mendil *et al.* (2009) hallaron valores máximos para el cobalto de 1,30 $\mu\text{g g}^{-1}$, para el cobre de 0,71 $\mu\text{g g}^{-1}$ y para el plomo de 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de oliva, y contenidos mínimos para el cobre de 0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ y de plomo de 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de girasol y de cobalto de 0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de maíz. Llorent-Martínez *et al.* (2011) determinaron contenidos de arsénico, cobre y plomo por debajo de 0,02, 0,004 y 0,009 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, en diferentes tipos de aceites vegetales.

El cadmio fue el elemento encontrado a niveles más bajos en todas las muestras analizadas, variando desde contenidos inferiores al límite de cuantificación (0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$) hasta 0,043 $\mu\text{g g}^{-1}$, correspondiente a la muestra de aceite de oliva-girasol de fritura. En relación a las muestras de aceite limpias, el que mayor contenido presentó de este elemento fue el aceite de semillas (0,040 $\mu\text{g g}^{-1}$). En la bibliografía se han descrito niveles de cadmio similares a los obtenidos en el presente estudio, comprendidos entre 0,0002 y 0,0045 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Pehlivan *et al.*, 2008), entre 0,0013 y 0,0123 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Bakkali *et al.*, 2009) y entre 0,006 y 0,053 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Chaves *et al.*, 2010), e incluso se han encontrado intervalos superiores comprendidos entre 1,51 y 5,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestras de aceite de girasol (Ansari *et al.*, 2009).

Los niveles de hierro y cinc encontrados oscilaron entre 0,31 y 8,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el hierro y 0,67 y 8,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el cinc. En ambos casos el mayor contenido se encontró en el aceite de

oliva-girasol-maíz de fritura, posiblemente debido a la absorción por parte de este tipo de aceite de estos elementos procedente de los alimentos que se han cocinado en ella. Los contenidos de hierro y cinc encontrados en este estudio son similares a los hallados por otros autores, como 2,4-7,53 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cinc en distintos tipos de aceite de girasol de distinta procedencia (Ansari *et al.*, 2009), entre 0,14 y 0,23 $\mu\text{g g}^{-1}$ de hierro en muestras de aceite de oliva virgen, girasol, sésamo y soja (Crindric *et al.*, 2007), y valores de 4,30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de hierro y de 3,13 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cinc en aceite de oliva y 2,26 $\mu\text{g g}^{-1}$ de hierro en aceite de soja, mientras que en el aceite de girasol los valores de estos elementos no pudieron ser cuantificados (Nunes *et al.*, 2011). Algunos autores, como Chaves *et al.* (2010), reportan contenidos de estos elementos sensiblemente superiores, presentando hasta 66 $\mu\text{g g}^{-1}$ de hierro y 46 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cinc en aceite de girasol o 93 $\mu\text{g g}^{-1}$ de hierro y 34 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cinc en aceite de soja.

Las diferencias en las concentraciones de estos metales en el aceite pueden ser debidas en gran medida, al tipo de suelo de cultivo, sobre todo en relación a la concentración total de estos elementos en el suelo y al pH del mismo. La abundancia y extensión de los compuestos de hierro en la naturaleza, justifica la presencia constante de este elemento en todos los productos vegetales.

Con respecto a los metales alcalinos (sodio y potasio), alcalinos-térreos (calcio y magnesio) y fósforo, los valores encontrados fueron superiores a los determinados mediante la aplicación de la normativa europea, ya que la mineralización ácida de las muestras permite la completa disolución de la matriz de la misma y, por tanto, el análisis del contenido total de dichos elementos. En el caso del calcio, los valores encontrados en los aceites varían entre 5,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de girasol de fritura y 91 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de maíz sin usar. Los niveles encontrados para el potasio variaron entre 3,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de maíz de fritura y 9,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de colza de fritura, mientras que para el magnesio los niveles encontrados estuvieron comprendidos entre valores inferiores al límite de cuantificación (0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$) para todos los aceites sin usar, excepto el aceite de oliva (2,8 $\mu\text{g g}^{-1}$), y 15,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de semillas de fritura. En cuanto al sodio, cabe destacar la elevada concentración encontrada en el aceite de colza de fritura (155 $\mu\text{g g}^{-1}$). Finalmente, los contenidos de fósforo encontrados oscilaron entre 4,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de oliva-girasol de fritura y 41 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de colza sin usar.

Los valores encontrados en la bibliografía para estos elementos presentan una gran variabilidad y su contenido depende, principalmente, de la procedencia de las semillas oleaginosas con las que se produce el aceite. Así, por ejemplo, Mendil *et al.* (2009) analizaron estos elementos en diversas muestras de aceites y grasas, encontrando contenidos de sodio comprendidos entre 1,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de girasol y 8,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de oliva, mientras que los contenidos de potasio variaron entre 1,30 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de avellana y 50,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la muestra de margarina. Los contenidos de calcio encontrados estaban comprendidos entre 20,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de avellana y 135,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de maíz, mientras que para el

magnesio los contenidos variaron entre $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de oliva y $20,8 \mu\text{g g}^{-1}$ en la muestra de mantequilla.

Chaves *et al.* (2010) determinaron contenidos de calcio comprendidos entre 16 y $27 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de girasol y soja, mientras que los contenidos de magnesio variaron entre 25 y $35 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de soja y girasol, valores superiores a los encontrados en el presente estudio. En cambio, para el sodio y el potasio los contenidos encontrados por estos autores eran, respectivamente, $25,4$ y $71 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de girasol y de $36,4$ y $19 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de soja. Finalmente, los contenidos de fósforo presentes en las muestras de aceite de soja y girasol se encontraron entre $5,8$ y $6,7 \mu\text{g g}^{-1}$, valores similares a los encontrados en este estudio para estos tipos de aceite.

En cuanto al cromo, los contenidos encontrados en las muestras de aceite analizadas fueron en su mayoría inferiores al límite de cuantificación del método propuesto ($0,1 \mu\text{g g}^{-1}$), con la excepción del aceite de colza de fritura ($0,42 \mu\text{g g}^{-1}$) y del aceite de soja girasol sin usar ($0,31 \mu\text{g g}^{-1}$). Los contenidos encontrados de cromo en el presente estudio son superiores a los encontrados por Pehlivan *et al.* (2008) para estos mismos tipos de aceites y similares a los hallados en el estudio realizado por Roca *et al.* (2000) en diferentes tipos de muestras de aceite de oliva (entre $0,20$ y $0,41 \mu\text{g g}^{-1}$). Bakkali *et al.* (2009) encontraron contenidos de cromo comprendidos entre $0,0073$ y $0,1254 \mu\text{g g}^{-1}$ en diferentes tipos de aceites vegetales (oliva virgen, oliva, girasol y maíz). Según Cindric *et al.* (2007), los contenidos de cromo en aceite de oliva, girasol, sésamo, arroz y soja estaban por debajo de $0,81 \mu\text{g g}^{-1}$.

Las concentraciones de aluminio encontradas en las diferentes muestras de aceite analizadas variaron entre contenidos inferiores o similares al límite de cuantificación ($1,4 \mu\text{g g}^{-1}$) y $2,21 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de oliva sin usar. Estos resultados son similares a los encontrados en la bibliografía, aunque existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos por otros autores. Las diferencias en los contenidos de aluminio en aceites pueden ser debidas, en gran medida, al tipo de suelo de cultivo, sobre todo en relación a la concentración total del elemento en el suelo y al pH del mismo. De esta forma, Zeiner *et al.* (2005) encontraron contenidos de aluminio similares a los del presente estudio, en aceites de oliva comerciales producidas en 14 zonas de Croacia, comprendidos entre $0,08$ y $1,11 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que Chaves *et al.* (2010) encontraron contenidos de aluminio en el aceite de girasol de $3,09 \mu\text{g g}^{-1}$ y bastante más elevados en el aceite de soja de hasta $32 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que Cindric *et al.* (2007) hallaron contenidos inferiores de este elemento metálico, de entre $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de girasol y $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de oliva.

En cuanto al bario, los contenidos encontrados variaron entre valores inferiores al límite de cuantificación ($0,02 \mu\text{g g}^{-1}$), para el aceite de girasol de fritura, y de $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$, para el aceite de maíz sin usar. En la bibliografía consultada no se han encontrado valores de referencia para este elemento en muestras de aceite.

En el caso del manganeso, los contenidos encontrados fueron muy similares para todas las muestras de aceite analizadas, en un intervalo comprendido entre $0,16 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de oliva de fritura y $0,26 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de maíz sin usar, mientras que los contenidos de molibdeno encontrados variaron entre valores inferiores al límite de cuantificación ($0,15 \mu\text{g g}^{-1}$) y $0,42 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de oliva sin usar. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los encontrados por otros autores, si bien resultan escasos los estudios realizados sobre molibdeno en muestras de aceite. No obstante, se observa una amplia variabilidad en los contenidos de estos elementos en diferentes tipos de aceites vegetales, lo que puede estar relacionado con el contenido de manganeso en el suelo de cultivo de las semillas oleaginosas con las que se producen los aceites (Roca *et al.*, 2000).

Chaves *et al.* (2010) encontraron contenidos de manganeso muy superiores a los obtenidos en el presente estudio en muestras de aceite de girasol y de soja con valores de $24,31$ y $23,26 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, y contenidos de molibdeno similares a los obtenidos con valores de $0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de girasol y $0,34 \mu\text{g g}^{-1}$ en aceite de soja. Mendil *et al.* (2009) también encontraron contenidos de manganeso superiores en aceite de maíz ($1,64 \mu\text{g g}^{-1}$), mientras que Zeiner *et al.* (2005) y Cindric *et al.* (2007) reportaron contenidos similares en muestras de aceite de oliva ($0,13 \mu\text{g g}^{-1}$) y de aceite de avellana ($0,42 \mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente. Según Llorent-Martinez *et al.* (2011), los contenidos de molibdeno en muestras de aceites vegetales de diferentes procedencia eran inferiores a $0,0015 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que los contenidos de manganeso estaban comprendidos entre $0,0035$ y $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aceite de maíz y de oliva, respectivamente.

VIII.4.3.2 Determinación de contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos en muestras de biodiesel

En la Tabla VIII.9 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de elementos metálicos y semimetálicos mediante ICP-AES para las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina, previa digestión ácida en horno de microondas.

Tabla VIII.9.- Contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos, en $\mu\text{g g}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, n=3), analizados por ICP-AES en las muestras de biodiesel objeto de estudio, previa mineralización en horno de microondas.

Muestra de biodiesel	Al	As	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
BAOL	<LQ	<LQ	0,095 \pm 0,05	9,7 \pm 0,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,3 \pm 0,4
BAOF	1,7 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	0,11 \pm 0,02	12,8 \pm 0,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,59 \pm 0,02
BAGF	1,4 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3	0,064 \pm 0,003	35,9 \pm 0,3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,36 \pm 0,03
BASL	<LQ	3,0 \pm 0,1	<LQ	6,0 \pm 0,2	0,032 \pm 0,001	<LQ	<LQ	<LQ	0,26 \pm 0,02
BASF	<LQ	6,1 \pm 0,3	0,101 \pm 0,005	19,0 \pm 0,5	0,042 \pm 0,001	<LQ	<LQ	<LQ	0,30 \pm 0,02
BACL	<LQ	<LQ	0,021 \pm 0,002	6,3 \pm 0,8	0,058 \pm 0,002	<LQ	<LQ	<LQ	0,26 \pm 0,05
BACF	<LQ	7,2 \pm 0,8	0,022 \pm 0,004	14,3 \pm 0,3	<LQ	<LQ	0,15 \pm 0,01	<LQ	0,30 \pm 0,01
BAML	7,4 \pm 0,5	4,5 \pm 0,4	0,18 \pm 0,05	15,6 \pm 0,6	0,15 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	<LQ	<LQ	2,04 \pm 0,01
BAMF	6,9 \pm 0,4	2,5 \pm 0,3	0,057 \pm 0,002	18 \pm 2	0,054 \pm 0,003	<LQ	<LQ	<LQ	0,27 \pm 0,03
BASGL	6,8 \pm 0,5	2,5 \pm 0,1	0,046 \pm 0,002	1,7 \pm 0,6	0,100 \pm 0,009	0,10 \pm 0,02	<LQ	<LQ	<LQ
BASGF	7,7 \pm 0,2	3,6 \pm 0,2	0,066 \pm 0,001	3,3 \pm 0,2	0,064 \pm 0,002	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
BAOGF	2,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,2	0,022 \pm 0,005	25,5 \pm 0,2	0,059 \pm 0,002	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
BAOGMF	<LQ	6,3 \pm 0,1	0,31 \pm 0,02	30,2 \pm 0,8	0,082 \pm 0,002	0,12 \pm 0,03	<LQ	<LQ	0,28 \pm 0,02

Cont. Tabla VIII.9.- Contenidos totales de elementos metálicos y semimetálicos, en $\mu\text{g g}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, n=3), analizados por ICP-AES en las muestras de biodiesel objeto de estudio, previa mineralización en horno de microondas.

Muestra de biodiesel	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P	Pb	V	Zn
BAOL	5,2 \pm 0,1	<LQ	<LQ	0,17 \pm 0,03	2,6 \pm 0,3	<LQ	4,4 \pm 0,3	<LQ	<LQ	0,58 \pm 0,01
BAOF	4,01 \pm 0,08	<LQ	<LQ	<LQ	6,8 \pm 0,4	2,72 \pm 0,08	9,2 \pm 0,8	<LQ	<LQ	0,96 \pm 0,04
BAGF	7,0 \pm 0,6	<LQ	<LQ	0,26 \pm 0,03	7,8 \pm 0,5	<LQ	7,8 \pm 0,5	<LQ	<LQ	2,0 \pm 0,1
BASL	2,4 \pm 0,1	<LQ	<LQ	<LQ	6,4 \pm 0,7	2,2 \pm 0,4	6,4 \pm 0,1	<LQ	<LQ	2,9 \pm 0,3
BASF	2,17 \pm 0,08	<LQ	<LQ	0,24 \pm 0,01	3,6 \pm 0,6	<LQ	5,9 \pm 0,6	<LQ	<LQ	6,2 \pm 0,4
BACL	6,4 \pm 0,3	<LQ	<LQ	<LQ	7,5 \pm 0,3	<LQ	10,7 \pm 0,5	<LQ	<LQ	1,6 \pm 0,1
BACF	8,0 \pm 0,3	<LQ	<LQ	0,15 \pm 0,02	5,7 \pm 0,2	<LQ	12,7 \pm 0,8	<LQ	<LQ	2,9 \pm 0,5
BAML	6,83 \pm 0,07	<LQ	0,055 \pm 0,05	0,19 \pm 0,01	1,6 \pm 0,4	<LQ	11,4 \pm 0,4	<LQ	<LQ	0,31 \pm 0,01
BAMF	9,4 \pm 0,1	<LQ	0,064 \pm 0,02	<LQ	3,9 \pm 0,2	<LQ	13,7 \pm 0,5	<LQ	<LQ	0,27 \pm 0,03
BASGL	2,2 \pm 0,3	<LQ	0,080 \pm 0,006	<LQ	1,6 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	12,4 \pm 0,6	<LQ	<LQ	0,30 \pm 0,02
BASGF	5,3 \pm 0,1	<LQ	0,077 \pm 0,005	<LQ	2,9 \pm 0,6	<LQ	8,5 \pm 0,5	<LQ	<LQ	0,32 \pm 0,04
BAOGF	6,3 \pm 0,2	<LQ	0,070 \pm 0,003	0,36 \pm 0,03	6,5 \pm 0,8	1,4 \pm 0,2	21 \pm 3	<LQ	<LQ	2,7 \pm 0,5
BAOGMF	2,6 \pm 0,1	<LQ	0,065 \pm 0,005	0,15 \pm 0,01	6,0 \pm 0,4	<LQ	13,6 \pm 0,9	<LQ	<LQ	2,1 \pm 0,1

Como se puede apreciar en la Tabla VIII.9, los contenidos de calcio encontrados en las muestras de biodiesel variaron entre $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de soja-girasol sin usar y $35,9 \mu\text{g g}^{-1}$ para el producido a partir de aceite de girasol de fritura. En cambio, los contenidos de magnesio encontrados fueron inferiores al límite de cuantificación ($0,91 \mu\text{g g}^{-1}$) para todas las muestras de biodiesel analizadas. En cuanto al contenido de sodio y potasio, se encontró que ambos estaban comprendidos en intervalos similares. Para el sodio se encontraron valores entre $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$, en las muestras obtenidas a partir de aceite de maíz y de soja-girasol sin usar, y $7,8 \mu\text{g g}^{-1}$ en la elaborada a partir de aceite de girasol de fritura, mientras que para el potasio se encontraron valores entre $2,17$ y $9,4 \mu\text{g g}^{-1}$ para las muestras producidas a partir de aceite de semillas y maíz de fritura, respectivamente. Los contenidos de fósforo encontrados estuvieron comprendidos entre $4,4 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de oliva sin usar y $21 \mu\text{g g}^{-1}$ para el obtenido a partir de aceite de oliva-girasol de fritura.

Se observan diferencias significativas al comparar estos resultados con los obtenidos al aplicar la normativa europea, debido a que la digestión ácida de las muestras permite destruir por completo la matriz del biodiesel, de forma que se determinan los contenidos totales de estos elementos, mientras que la aplicación de las normas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003 no implica la disolución total de la matriz de la muestra, ya que las determinaciones se realizan sobre diluciones de la propia muestra de matriz orgánica, por lo que los contenidos determinados son sensiblemente inferiores a los obtenidos al realizar la mineralización.

Los resultados obtenidos previa mineralización ácida de las muestras están de acuerdo con los valores encontrados en la bibliografía. Así, por ejemplo, según Chaves *et al.* (2008a) la determinación del contenido de sodio y potasio es fundamental en las muestras de biodiesel porque los hidróxidos de estos elementos se emplean como catalizadores durante el proceso de obtención del biodiesel y pueden contribuir al desgaste de las partes metálicas del motor. Los contenidos de sodio y potasio encontrados por estos autores variaron entre $3,60$ y $3,73 \mu\text{g g}^{-1}$ de sodio para el biodiesel obtenido a partir de aceite de fritura y de soja, mientras que para el potasio se encontraron valores entre $2,2$ y $64 \mu\text{g g}^{-1}$ para el de aceite de soja y el de fritura. Otros autores reportaron contenidos de sodio inferiores, como de Souza *et al.* (2008), con $0,14$ y $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ de sodio en muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de soja y de girasol, respectivamente.

En cambio, según de Oliveira *et al.* (2009) sólo es necesario analizar el contenido de sodio en muestras de biodiesel, ya que generalmente el hidróxido sódico es el catalizador más empleado en su producción. Estos autores reportaron contenidos totales de sodio superiores a los del presente estudio, del orden de 20 y $30 \mu\text{g g}^{-1}$ para biodiesel elaborado a partir de aceite de soja y de girasol, respectivamente.

De Jesus *et al.* (2008) encontraron contenidos de sodio en muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de soja entre $0,94$ y $36,2 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que los contenidos de

potasio estaban comprendidos entre 0,29 y 156 $\mu\text{g g}^{-1}$. Posteriormente, estos mismos autores (de Jesus *et al.*, 2010) analizaron el contenido de calcio y magnesio en varios tipos de muestras de biodiesel producidas a partir de aceites vegetales, obteniendo contenidos de magnesio comprendidos entre 0,4 y 8,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de colza y de calcio con valores entre 2,1 y 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestras de biodiesel de aceite de girasol.

En un estudio reciente, Korn *et al.* (2010) analizaron el contenido de calcio, potasio, sodio y fósforo en muestras de biodiesel de aceite de soja, obteniendo resultados similares a los del presente estudio (15, 2, 8 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). El contenido de magnesio encontrado era inferior al límite de cuantificación del método propuesto por estos autores, consistente en una digestión en horno de microondas con $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (7:1, v/v) y análisis mediante ICP-AES.

Iqbal *et al.* (2010) determinaron el contenido de calcio, magnesio, sodio y fósforo en muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de colza mediante ICP-AES previa mineralización ácida, alcanzando valores de 14,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de calcio, 0,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ de magnesio, 81,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de sodio y 0,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ de fósforo.

Como se puede apreciar en la Tabla VIII.9, los resultados obtenidos mostraron contenidos de cobre, plomo y vanadio por debajo del límite de cuantificación del método para todas las muestras de biodiesel analizadas. En el caso del cromo, todos los contenidos encontrados también fueron inferiores al límite de cuantificación (0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$), con la excepción de la muestra de biodiesel de aceite de colza de fritura (0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$). Los contenidos de cadmio oscilaron entre valores inferiores al límite de cuantificación (0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$) y 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de maíz sin usar. Silva *et al.* (2010) encontraron contenidos de cadmio inferiores a los del presente estudio, con un valor de 0,0025 $\mu\text{g g}^{-1}$ en biodiesel de aceite de soja y un contenido de plomo de 0,023 $\mu\text{g g}^{-1}$ en biodiesel de aceite de girasol.

En relación a los contenidos de cobalto en las muestras de biodiesel analizadas, se observa que todos son inferiores al límite de cuantificación (0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$) con la excepción del biodiesel de los aceites de maíz y de soja-girasol sin usar y de oliva-girasol-maíz de fritura (0,13, 0,10 y 0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente). De forma similar, los contenidos de níquel encontrados variaron entre valores que eran inferiores al límite de cuantificación (1,48 $\mu\text{g g}^{-1}$) y 2,72 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel obtenido a partir de aceite de oliva de fritura.

Lobo *et al.* (2011) determinaron el contenido de níquel y cadmio en muestras de biodiesel de aceite de girasol y de soja, obteniendo contenidos de cadmio entre 0,2 y 0,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, y de níquel inferiores al límite de cuantificación del método propuesto por estos autores (microemulsión), lo que hace que, desde el punto de vista medioambiental, el biodiesel sea más adecuado que los combustibles derivados del petróleo, los cuales suelen presentar mayores contenidos de níquel. Según Chaves *et al.* (2008), los contenidos de cobalto y vanadio en muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de

fritura y de soja fueron inferiores al límite de cuantificación del método propuesto, mientras que el biodiesel de aceite de soja presentó el mayor contenido de cobre y de níquel (0,142 y 0,0104 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente).

Ghisi *et al.* (2010) encontraron contenidos de cobre inferiores a 0,046 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestras de biodiesel elaboradas a partir de aceite de fritura y de soja. En cambio, Iqbal *et al.* (2010) analizaron muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de colza, obteniendo valores de 0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cadmio, 0,26 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cobalto, 0,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cromo, 0,69 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cobre, 0,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ de níquel, 0,27 $\mu\text{g g}^{-1}$ de plomo y 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ de vanadio. Se observa una gran variabilidad en los resultados propuestos por los diferentes autores, en función del tipo y de la procedencia de la materia prima con la que se ha elaborado el biodiesel.

Los contenidos de hierro encontrados en las muestras de biodiesel analizadas variaron entre valores inferiores al límite de cuantificación (0,28 $\mu\text{g g}^{-1}$) y 2,04 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el biodiesel de aceite de maíz sin usar. Respecto a los contenidos de manganeso, los contenidos encontrados variaron entre valores inferiores al límite de cuantificación (0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$) y 0,080 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el biodiesel elaborados a partir de aceite de soja-girasol sin usar. Estos resultados son similares a los encontrados por Chaves *et al.* (2008), que reportaron contenidos de hierro y manganeso en biodiesel de aceite de fritura de 0,375 y 0,076 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, otros autores como de Souza *et al.* (2008) o Ghisi *et al.* (2010) encontraron contenidos de hierro inferiores a los del presente estudio, como 0,04 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de soja, 0,09 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de girasol, e inferiores a 0,073 $\mu\text{g g}^{-1}$ para biodiesel producido a partir de aceite de fritura y de soja. Por el contrario, Iqbal *et al.* (2010) encontraron contenidos similares de hierro en muestras de biodiesel de aceite de colza (0,17 $\mu\text{g g}^{-1}$), aunque los contenidos de manganeso encontrado por estos autores fueron superiores a los encontrados en el presente estudio (0,49 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Respecto a los contenidos de arsénico encontrados en las muestras de biodiesel analizadas, se hallaron niveles que variaron entre contenidos inferiores al límite de cuantificación (1,55 $\mu\text{g g}^{-1}$) y 7,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de colza de fritura. Teniendo en cuenta que los contenidos de arsénico fueron inferiores al límite de cuantificación para todas las muestras de aceite analizadas, cabe pensar que o bien ha habido un proceso de concentración o este elemento ha podido ser introducido en las muestras de biodiesel durante el proceso de producción y/o lavado, presumiblemente por la existencia de trazas de este elemento en los reactivos empleados durante la reacción de transesterificación o en los productos utilizados en las etapas posteriores de lavado. Estas hipótesis deben ser estudiadas en un trabajo posterior a esta Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por Vieira *et al.* (2009), con contenidos de arsénico de 1,8 y 4,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestras de biodiesel de aceite de soja y de girasol, respectivamente, mientras que Iqbal *et al.* (2010) reportaron un contenido de arsénico de 0,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ en biodiesel de aceite de colza. Mediante el método propuesto por Vieira *et al.* (2009) consiguieron obtener un límite de detección de 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el arsénico, por lo que afirmaron que la metodología

propuesta era adecuada para el análisis de este elemento cuando sea obligatorio determinar su contenido en muestras de biodiesel mediante alguna normativa.

Los contenidos de aluminio encontrados en las muestras de biodiesel analizadas en el presente estudio estaban comprendidos entre valores inferiores al límite de cuantificación ($1,39 \mu\text{g g}^{-1}$) y $7,7 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel elaborado a partir de aceite de soja-girasol de fritura. Con respecto a los contenidos de bario, éstos variaron entre $0,021 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de colza sin usar y $0,31 \mu\text{g g}^{-1}$ para el de oliva-girasol-maíz de fritura, con la excepción del biodiesel de aceite de semillas sin usar cuyo contenido de bario estaba por debajo del límite de cuantificación del método ($0,02 \mu\text{g g}^{-1}$). Finalmente, los contenidos de molibdeno encontrados estaban comprendidos entre valores inferiores al límite de cuantificación ($0,15 \mu\text{g g}^{-1}$) y $0,36 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de oliva-girasol fritura, y los contenidos de cinc se encontraron entre $0,27 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de maíz de fritura y $6,2 \mu\text{g g}^{-1}$ para el de aceite de semillas de fritura.

Estos cuatro elementos no han sido estudiados en muestras de biodiesel según la bibliografía consultada. Recientemente, Iqbal *et al.* (2010) analizaron muestras de biodiesel elaboradas a partir de aceite de colza mediante ICP-MS, consiguiendo resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, con valores de $3,02 \mu\text{g g}^{-1}$ para el aluminio, de $0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ de bario, de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para el molibdeno y de $0,85 \mu\text{g g}^{-1}$ de cinc.

VIII.5 Conclusiones

- La determinación de sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo en biodiesel utilizando las normas europeas UNE-EN 14538:2006 y UNE-EN 14107:2003 permitió establecer que todas las muestras de biodiesel obtenidas mediante catálisis homogénea alcalina verifican los límites establecidos para estos elementos, con la excepción de las muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite de maíz de fritura y de aceite de soja-girasol de fritura, que sobrepasan ligeramente el contenido mínimo establecido en la normativa para el fósforo.

- Se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación simultánea de aluminio, arsénico, bario, calcio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, fósforo, plomo, vanadio y cinc en muestras de aceite y biodiesel mediante ICP-AES, previa mineralización ácida de las muestras en horno de microondas.

- Se ha optimizado la mineralización en horno de microondas de las muestras de aceite y biodiesel a una temperatura de $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y con un tiempo de mantenimiento de 15 minutos, empleando 10 mL de una mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno en proporción 4:1 (v/v), como mezcla de digestión, y una cantidad de muestra de aceite o biodiesel de, aproximadamente, 0,3 g. El método se ha validado mediante estudios de recuperación realizados sobre muestras de aceite y biodiesel enriquecidas a dos niveles de concentración.

● Los límites de cuantificación del método analítico están comprendidos entre valores de $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ para bario, cadmio y manganeso y $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para aluminio, arsénico y níquel. Los % RSD son inferiores al 5 % para todos los elementos estudiados.

● Las muestras de aceite mostraron contenidos de arsénico, cobalto, cobre, níquel, plomo y vanadio por debajo del límite de cuantificación del método, mientras que los contenidos de aluminio, cadmio, bario, cromo, magnesio y molibdeno sólo pudieron ser cuantificados en algunos aceites. El aceite de maíz sin usar presentó los mayores contenidos de bario, calcio y manganeso; el aceite de oliva-girasol-maíz de fritura los de hierro y cinc; el aceite de colza sin usar el de fósforo; y el aceite de colza de fritura los mayores contenidos de potasio y sodio.

● Todos los biodiesel analizados mostraron contenidos de cobre, magnesio, plomo y vanadio por debajo del límite de cuantificación del método, mientras que los de cobalto, cromo y níquel sólo se pudieron determinar en tres, una y cuatro muestras, respectivamente. Los contenidos de aluminio, arsénico, bario, cadmio, hierro, manganeso y molibdeno sólo pudieron ser cuantificados en algunas muestras de biodiesel.

● El biodiesel de aceite de girasol de fritura presentó los mayores contenidos de calcio y sodio, y uno de los más elevados de potasio, mientras que el biodiesel de aceite de maíz de fritura presentó los mayores contenidos de potasio y fósforo, y el biodiesel de semillas de fritura presentó el mayor contenido de cinc.

● Se han observado diferencias significativas entre los resultados obtenidos al aplicar el método recomendado por la normativa europea y los obtenidos después de la mineralización de las muestras, debidas a que la digestión ácida permite destruir por completo la matriz del biodiesel.

● La diferencia encontrada entre las muestras de aceite y biodiesel en cuanto a los contenidos de arsénico es destacable ya que, mientras que en las muestras de aceite todos los contenidos de arsénico estaban por debajo del límite de cuantificación, en las muestras de biodiesel se encontraron contenidos de arsénico de hasta $7,2 \mu\text{g g}^{-1}$ para el biodiesel de aceite de colza de fritura.

CAPÍTULO IX

A decorative graphic consisting of a thick horizontal line and a thin vertical line intersecting at the right end of the horizontal line, positioned to the right of the chapter title.

CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE ACEITE Y BIODIESEL POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON DESORCIÓN/IONIZACIÓN POR LÁSER ASISTIDA POR UNA MATRIZ (MALDI) Y ANÁLISIS POR TIEMPO DE VUELO (TOF)

Como se ha expuesto en los capítulos anteriores, en la presente Tesis se estudia la caracterización de muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites vegetales mediante reacción de transesterificación. En el presente capítulo se desarrolla una nueva metodología analítica para seguir de forma rápida y efectiva la reacción de transesterificación de aceites vegetales, mediante la utilización de la espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por una matriz y análisis por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Se estudiaron los espectros de masas de las 14 muestras de aceites vegetales tanto sin usar como procedentes de procesos de fritura utilizadas en el Capítulo V para la obtención del biodiesel y se determinaron los di y triglicéridos presentes en las mismas, así como los posibles productos originados por la degradación térmica de las muestras de aceite de fritura. De la misma forma, se analizaron los espectros de masas de las 14 muestras de biodiesel obtenidas a partir de estas muestras de aceites. Se pudo comprobar que la mayoría de las muestras de biodiesel no presentaban di y triglicéridos, lo que permite afirmar, de forma rápida y sencilla, que la reacción de transesterificación ha sido exitosa. De igual forma, se utilizó la presente metodología para estudiar la adulteración de muestras de biodiesel con los aceites de procedencia mediante MALDI-TOF MS. Con este nuevo método se puede afirmar que una muestra de biodiesel es realmente este biocombustible.

IX.1 Antecedentes

IX.1.1 Aceites vegetales y grasas animales

IX.1.1.1 Composición

Los aceites vegetales y las grasas animales están constituidos por un elevado número de compuestos, tratándose, en su conjunto, de una matriz de elevada complejidad, por lo que se emplean diferentes técnicas analíticas para identificar y cuantificar sus numerosos y variados componentes. Algunos de estos métodos han sido adoptados y regulados por organismos de carácter oficial como el Consejo Oleícola Internacional o la Comisión del *Codex Alimentarius*, mientras que otros, consistentes en técnicas analíticas más sofisticadas y metodologías más novedosas, han sido propuestos por diversos autores según la bibliografía consultada.

La caracterización de los aceites vegetales y las grasas animales supone una ardua tarea, marcada por la determinación de la composición de los ácidos grasos que los forman. Sin embargo, en la actualidad se puede afirmar que la caracterización de un aceite o grasa no está completa sin la determinación de las especies moleculares que la componen. En cualquier tipo de aceite o grasa, es importante llevar a cabo la determinación de los triglicéridos presentes, puesto que se trata de la fracción lipídica más abundante en su naturaleza, además de ser la más compleja debido a las posibles combinaciones de los diferentes ácidos grasos que están presentes (Berqvist *et al.*, 1993).

Desde el punto de vista químico, los aceites vegetales están constituidos, principalmente, por triglicéridos (95-98 %) y otros componentes minoritarios (2-5 %) (Kiritsakis *et al.*, 1998, 2002; Aparicio *et al.*, 2000; Wiesman *et al.*, 2010). Estos componentes minoritarios se encuentran en diferentes proporciones dependiendo del tipo de aceite vegetal, condiciones agronómicas y climáticas, especie y calidad de los frutos, sistemas de extracción y procesos de refinación y condiciones de almacenamiento (Cert *et al.*, 2000). Dichos componentes están constituidos por derivados de triglicéridos y otras familias de compuestos, como mono- y diglicéridos, FFA y compuestos insaponificables. Los mono- y diglicéridos están presentes en pequeñas cantidades debido, principalmente, a la hidrólisis de los triglicéridos, dentro de la fracción insaponificable, se encuentran los carotenoides, tocoferoles, tocotrienoles, alcoholes grasos lineales, alcoholes triterpénicos, alcoholes diterpénicos, fosfolípidos, metil esteroides y esteroides (Cert *et al.*, 2000; Monti *et al.*, 2001; Eldin, 2006; Chapagain *et al.*, 2009b; Saraiva *et al.*, 2009).

La composición molecular de la mezcla de triglicéridos en los diferentes tipos de aceites suele ser muy compleja debido a la existencia de una gran variedad de ácidos grasos, que difieren en la longitud de la cadena carbonada, en el grado de insaturación y en su distribución entre los enlaces sencillos, dobles y triples en el esqueleto carbonado (Saraiva *et*

al., 2009). Por lo tanto, es necesario disponer de un método analítico fiable y rápido que permita determinar tanto el perfil de ácidos grasos como la composición de triglicéridos en las muestras de aceite (Chapagain *et al.*, 2009b).

Existe un conjunto de metodologías para el análisis de aceites y grasas que aportan ventajas derivadas del uso de técnicas instrumentales más sofisticadas con una mayor sensibilidad, rapidez de análisis, posibilidad de automatización, etc. En la mayoría de los casos, al tratarse de una muestra compleja, el análisis de algún componente concreto del aceite requiere el empleo de una técnica de separación, como GC, HPLC o CE. Sin embargo, estas técnicas presentan el inconveniente de requerir una etapa previa de derivatización, con objeto de incrementar la volatilidad del analito en el caso de GC y para hacerlo detectable en HPLC. Esta etapa de derivatización conlleva un determinado tiempo y aumenta la posibilidad de pérdida de muestra, dilución y/o contaminación del analito (Frazier *et al.*, 1999). Estas técnicas analíticas de separación precisan de un sistema de detección adecuado, como es la espectrometría de masas.

IX.1.1.2 Aplicación de la espectrometría de masas para el análisis de aceites y grasas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas presentes en una muestra son ionizados en modo positivo o negativo, aunque con mayor frecuencia positivamente, y separados de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Esta técnica proporciona una elevada especificidad para determinar, con exactitud, la masa molecular de un analito o para obtener información útil sobre los fragmentos iónicos resultantes. Además, la MS presenta una sensibilidad elevada y, en teoría, permite detectar una única molécula o aductos moleculares de sodio o potasio, elucidar la estructura química de los compuestos, etc. La MS se puede aplicar a todo tipo de muestras ya sean volátiles o no volátiles; polares o apolares; sólidas, líquidas o gaseosas (Martín Gómez *et al.*, 2010).

Las principales etapas de un análisis por MS son las siguientes:

1. Ionización de la muestra, en la que los átomos o moléculas se transforman en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones
2. Separación de los iones según su relación m/z
3. Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica

El espectro de masas es una representación gráfica de la abundancia relativa, en porcentaje, de los iones producidos respecto a su relación m/z . La señal correspondiente a un ión aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del mencionado ión. La información obtenida por MS es esencialmente cualitativa, como es la determinación de la masa molecular o la información estructural a partir de los fragmentos obtenidos, pero también se pueden realizar análisis cuantitativos

mediante calibrados con patrones internos o externos alcanzando límites de detección desde picomoles a femtomoles (Martín Gómez *et al.*, 2010).

La MS se ha utilizado para la caracterización de los distintos componentes del aceite, principalmente como sistema de detección después de técnicas de separación como GC, HPLC y CE. Así, las técnicas de MS que utilizan la ionización química a presión atmosférica (APCI), la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) se han aplicado al análisis de triglicéridos no volátiles, siendo estos métodos mucho más rápidos que los métodos cromatográficos tradicionales (Stübiger *et al.*, 2003).

Entre las técnicas analíticas más ampliamente empleadas para la caracterización de aceites y grasas en base a la composición en ácidos grasos, se encuentra la GC-MS. Inicialmente se realiza una hidrólisis previa de los triglicéridos presentes, y posteriormente, una etapa de derivatización, basada en la reacción de transesterificación de los FFA a FAMES. Finalmente, los FAMES formados se analizan por GC-MS (Gamazo-Vázquez *et al.*, 2003). Este método permite identificar la presencia de aceites adulterados.

Ruiz-Samblás *et al.* (2010) desarrollaron un método para el análisis de triglicéridos en muestras de aceite mediante GC-MS, empleando un sistema de impacto electrónico como fuente de ionización. De esta forma, consiguieron separar los triglicéridos presentes en la muestra de aceite de acuerdo a su número equivalente de carbono y al grado de insaturación de la cadena carbonada. La principal ventaja de esta técnica es que la muestra de aceite sólo se disuelve en cloroformo y no necesita una etapa de preparación previa al análisis.

La estructura de los triglicéridos presentes en aceites y grasas también puede determinarse mediante el acoplamiento instrumental HPLC-MS (Ranalli *et al.*, 2002) separándose los ácidos grasos según el número de átomos de carbono y su grado de insaturación mediante la utilización de columnas rellenas con fases ligadas y el empleo de mezclas acetonitrilo/2-propanol, en diferentes proporciones, como fases móviles.

Aunque existen varias técnicas de ionización utilizadas en la MS para medir el contenido de triglicéridos, sólo unas pocas son adecuadas para su acoplamiento con HPLC. La ionización química a presión atmosférica (APCI) es la técnica más frecuentemente asociada a HPLC-MS para el análisis de triglicéridos, debido a que los espectros de masas son relativamente simples existiendo la posibilidad de identificar los isómeros posicionales de cada uno de ellos (Jakab *et al.*, 2002; Holčapek *et al.*, 2003; Fauconnot *et al.*, 2004; List *et al.*, 2005; Mondello *et al.*, 2005; Dugo *et al.*, 2006; Lisa *et al.*, 2009; Fasciotti *et al.*, 2010).

Nagy *et al.* (2005) describieron un método basado en el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa con la espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (RP-HPLC-APCI-MS) y el análisis quimiométrico de los resultados para la caracterización y clasificación de muestras de aceites de oliva de distinta procedencia. El método empleado para la determinación de triglicéridos es relativamente sencillo, ya que las muestras de aceite se diluyen en metanol y se inyectan directamente en el

sistema, sin necesidad de ninguna etapa previa de purificación o derivatización. La separación de los di- y triglicéridos se consigue en un tiempo inferior a los 20 minutos utilizando una columna de octadecil-silica. El APCI permite obtener una elevada sensibilidad al detectar 50 componentes presentes en la muestra de aceite de oliva estudiada.

Por otra parte, se ha empleado la asociación de la MS con la ionización mediante electrospray (ESI-MS) para la clasificación de muestras de aceites vegetales. La caracterización se ha realizado en base al contenido en ácidos grasos y utilizando técnicas quimiométricas como alternativa a las técnicas utilizadas tradicionalmente con objeto de reducir el tiempo de análisis (Goodacre *et al.*, 2002). Asimismo, se ha demostrado que en ESI-MS, mediante inyección directa de un extracto de aceite en metanol/agua (1:1), operando en modo positivo, pueden diferenciarse distintos tipos de aceites vegetales y mezclas de ellos, incluyendo aceite de oliva. Mientras que en modo negativo se puede detectar la presencia de adulteraciones de aceite de oliva con otros tipos de aceites refinados. El método también permite determinar la edad de las muestras de aceite, ya que los espectros obtenidos por ESI-MS para un aceite conservado a temperatura ambiente durante dos años presentan diferentes relaciones m/z con respecto a un aceite nuevo, por lo que esta información se podría utilizar para diagnosticar la antigüedad de un aceite (Wu *et al.*, 2004; Catharino *et al.*, 2005; Lerma-García *et al.*, 2008).

Simas *et al.* (2010) establecieron un método para la caracterización de aceites vegetales basado en EASI-MS. Esta nueva técnica permite determinar el perfil de triglicéridos y ácidos grasos libres presentes en aceites vegetales, detectando principalmente los triglicéridos como aductos sodiados y los FFA como iones protonados. Los mono- y diglicéridos también se pueden detectar mediante EASI-MS, ya que se puede asegurar que en las condiciones de trabajo no se produce la fragmentación de los triglicéridos mediante la utilización de esta técnica de ionización. Este método es realmente simple puesto que sólo requiere la colocación de una pequeña gota de aceite, que no ha sido tratada previamente, sobre una superficie inerte bajo unas determinadas condiciones ambiente. Este acoplamiento permite controlar de manera rápida la adulteración de una muestra de aceite, por lo que se puede utilizar para el control de calidad de aceites.

La técnica se ha aplicado para identificar la composición en di y triglicéridos en muestras de aceite sometidas previamente a cromatografía en capa fina (TLC), usando acetato de etilo como eluyente, observándose que ambas especies eluyen al mismo tiempo. La TLC-EASI-MS permite, por lo tanto, la identificación de los di y triglicéridos como especies sodiadas y protonadas, lo que hacen de ésta una técnica prometedora para la identificación de estas especies en muestras de biodiesel, así como para el control de calidad de las mismas, debido a que en la reacción de transesterificación se debería transformar todas las especies presentes en los aceites de partida (mono, di y triglicéridos) en FAMES (Haddad *et al.*, 2008).

Los triglicéridos presentes en un aceite también pueden determinarse utilizando como técnica de ionización, la desorción/ionización por láser (LDI), en ausencia de matriz, en lugar

del MALDI que requiere una preparación de muestra utilizando una matriz con lo que se presentan problemas de interferencia de los picos de la misma con las señales de los analitos (Calvano *et al.*, 2005).

IX.1.1.3 Aplicación de la técnica MALDI-TOF MS al análisis de aceites

En el sistema de ionización se mezcla una disolución del analito con un gran exceso de una sustancia matriz que absorbe la radiación. Esta mezcla muestra-matriz se deposita en una placa de acero inoxidable o *target* y se introduce, tras la evaporación del disolvente, en el espectrómetro de masas. La mezcla se irradia con un láser pulsante de elevada potencia, durante unos nanosegundos, lo que provoca una rápida sublimación de las moléculas del analito y de la matriz. Los iones formados, en fase gaseosa, se introducen en un detector de tiempo de vuelo para su análisis según las relaciones m/z . Una característica fundamental del MALDI es que la matriz empleada es capaz de absorber una elevada cantidad de energía a la longitud de onda del láser de nitrógeno ($\lambda=337$ nm) y, al mismo tiempo, la energía emitida es cedida a las moléculas de la muestra, permitiendo su desorción y transformación en iones en fase gaseosa.

Posteriormente, la aplicación de un potencial eléctrico elevado (20-25 kV) acelera los iones formados desde el *target* hacia el tubo de vuelo del analizador (TOF), donde no existe campo eléctrico. Para un voltaje de aceleración dado, el tiempo de vuelo empleado por un ión para alcanzar el detector (microsegundos) es proporcional a su m/z . De esta forma, los fragmentos pequeños se mueven más rápido que los grandes, por lo que al detector llegan las partículas en orden creciente (modo lineal). El resultado es la representación de la intensidad relativa (abundancia) de cada analito frente a la relación m/z , dando lugar al espectro de masas. La resolución de MALDI-TOF MS se puede mejorar con el empleo de un espejo de iones o “reflectrón” al final del tubo de vuelo. En el reflectrón, los iones son reflejados hacia el detector, compensando las pequeñas diferencias de energía cinética que pueda existir entre dos iones idénticos, lo que aumenta mucho la exactitud en el rango de detección.

La matriz utilizada en MALDI-TOF MS es crucial en el proceso de ionización de la muestra. Su función es doble, por un lado, absorber la mayor parte de la energía procedente del láser, y por otro lado, actuar como disolvente del analito, reduciendo las fuerzas intermoleculares y disminuyendo al mínimo la agregación de moléculas de analito. Los iones generados mediante esta técnica son, mayoritariamente, moléculas monoprotonadas, aunque también se pueden formar iones oligoméricos protonados con doble y triple carga. Además, se pueden formar aductos de las moléculas de la muestra con sodio o potasio, especialmente en muestras de origen biológico como los aceites o el biodiesel.

MALDI-TOF MS se empleó inicialmente para el análisis de proteínas y péptidos, polímeros sintéticos e hidratos de carbono. Algunos estudios posteriores han demostrado que

también se puede emplear para la caracterización de aceites vegetales y grasas animales, mediante la identificación y determinación del contenido de triglicéridos en diferentes tipos de aceites (Asbury *et al.*, 1999; Ayorinde *et al.*, 2000; Schiller *et al.*, 2000; Stübiger *et al.*, 2003) y también se ha utilizado para la determinación de diglicéridos, triglicéridos oxidados y otros compuestos producidos a partir de la degradación térmica de los aceites (Schiller *et al.*, 2002a, 2002b; Picariello *et al.*, 2009). Sus principales ventajas son simplicidad, rapidez y posibilidad de determinar los triglicéridos presentes en los aceites sin necesidad de una etapa de separación ni derivatización previa de la muestra como en otras técnicas de ionización (Asbury *et al.*, 1999; Ayorinde *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c; Al-Saad *et al.*, 2003; Guyon *et al.*, 2003; Calvano *et al.*, 2005; Lay *et al.*, 2006; Picariello *et al.*, 2007).

MALDI-TOF MS origina una fragmentación mínima de las moléculas del analito, lo que permite el análisis de estructuras complejas de triglicéridos en pocos minutos. El sistema de ionización mediante MALDI es muy adecuado para el análisis de lípidos, ya que tanto la muestra como la mayoría de las matrices empleadas son solubles en disolventes orgánicos, formando una única fase orgánica. Esto da lugar a una mezcla homogénea matriz/analito, lo que es fundamental en MALDI. Los *target* empleados en MALDI permiten el análisis de varias muestras de forma automatizada siendo tan sólo necesario 1,0 µL de muestra de aceite disuelta en un disolvente orgánico colocado sobre la matriz (Schiller *et al.*, 2000). En la Figura IX.1 se muestra una imagen de un *target* utilizado en MALDI. En cada uno de los pocillos o *spot* se puede colocar una muestra de aceite diferente.

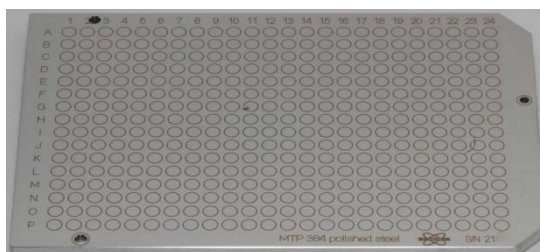


Figura IX.1.- Imagen de la placa metálica o *target* empleado en MALDI.

Asbury *et al.* (1999) describieron un método para determinar la composición de triglicéridos en aceites de semillas de cebolla por MALDI-TOF MS. Emplearon varias matrices, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), 1,8-dihidroxi-antrona (ditranol) y una matriz líquida constituida por $K_4[Fe(CN)_6]$ /glicerol. Los mejores resultados, en términos de reproducibilidad y resolución de la separación de los triglicéridos se obtuvieron cuando se empleó el DHB como matriz. Una vez optimizado el método se aplicó a una muestra de aceite nueva y a una almacenada durante dos años, ambas producidas a partir de semillas de cebollas. Al comparar los espectros para los dos tipos de muestras se observó, en el de la muestra envejecida, la aparición de nuevas relaciones m/z , que fueron asociadas a productos de oxidación generados durante el proceso de almacenamientos de la muestra.

Ayorinde *et al.* (1999a) desarrollaron un método basado en MALDI-TOF MS para determinar los triglicéridos mayoritarios presentes en aceite de linaza, nuez, semillas de sésamo, semillas de uvas y avellanas. La matriz empleada fue el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), disuelto en una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano, y los espectros obtenidos estaban formados por las moléculas de los triglicéridos sodiadas $[M + Na]^+$. Se observó que el ácido linolénico es el componente principal del aceite de linaza, mientras que el ácido linoleico es el más abundante en el aceite de nuez y en el de semillas de uva, los ácidos oleico y linoleico son los mayoritarios en el aceite de sésamo y el ácido oleico es el componente principal del aceite de avellana. Además, este trabajo pone de manifiesto la versatilidad y sencillez de MALDI-TOF MS para llevar a cabo la caracterización de mezclas complejas de triglicéridos presentes en diferentes tipos de aceites.

Este mismo método se aplicó para determinar la composición en triglicéridos de muestras de aceite de colza, ricino y de oliva procedentes de diferentes tipos de aceitunas (Ayorinde *et al.*, 1999b), así como de una muestra de aceite de *Vernonia galamensis*, que es un tipo de aceite utilizado en polímeros, cosméticos y productos oleoquímicos (Ayorinde *et al.*, 1999c). Estos estudios muestran una muy buena resolución de m/z , por lo que MALDI-TOF MS permite determinar, en aceites vegetales, la distribución de triglicéridos que sólo difieren en el grado de insaturación en su cadena carbonada. Por lo tanto, el método propuesto por estos autores se puede aplicar a diferentes tipos de muestras de aceites de distintos orígenes para caracterizar e identificar los principales triglicéridos presentes en las mismas.

MALDI-TOF MS también se ha aplicado al análisis de triglicéridos en muestras de grasas vegetales como la mantequilla. Guyon *et al.* (2003) describieron un método para establecer la composición en triglicéridos en muestras de mantequilla de cacao de distinta procedencia, y compararon los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS y por GC-MS. La determinación del perfil de triglicéridos mediante GC-MS implica una extracción Soxhlet de la muestra durante 4 horas, utilizando un reflujo de isohexano, secando a continuación los triglicéridos durante 3 horas a 60 °C. En cambio, mediante MALDI-TOF MS la muestra sólo requiere de su disolución en una mezcla cloroformo/metanol. En este caso se empleó como matriz una disolución de ioduro sódico en cloroformo/metanol. Estos autores concluyeron que los resultados obtenidos con ambas técnicas eran muy similares, pero se decantaron por la MALDI-TOF MS en términos de preparación de muestra y en tiempos de análisis de tan sólo unos minutos.

Saraiva *et al.* (2009) aplicaron por primera vez MALDI-TOF MS seca, es decir, no emplearon disolventes orgánicos, ni para disolver la matriz ni para la dilución de las muestras de aceite, con objeto de determinar la composición de triglicéridos en los principales aceites (*andiropa*, *Brazil nut*, *buriti* y fruta de la pasión) y grasas (*cupuaçu*, *murumuru* y *ucuba*) amazónicas, proporcionando un método rápido para la determinación de los *fingerprints* (huellas dactilares) de las muestras de aceite. Para ello, mezclaron la muestra de aceite o de grasa con la matriz sólida en polvo (DHB) en un pequeño molino de bolas, obteniendo una pasta, que se depositó en los pocillos o *spot* del *target*. La principal ventaja de esta

metodología es la homogeneidad con la que se deposita la muestra, lo que mejora significativamente la reproducibilidad y la rapidez del método de análisis.

Por otro lado, MALDI-TOF MS también se ha empleado para realizar un seguimiento de la oxidación térmica de los triglicéridos, simulando las condiciones empleadas en los procesos prolongados de fritura (180 °C durante 6 horas) de los aceites vegetales comestibles. En este caso, MALDI-TOF MS suele acoplarse con una técnica cromatográfica para separar los componentes no polares de los polares presentes en el aceite calentado, lo que suele realizarse sobre una columna rellena con un gel de silicona. Esta separación previa al análisis por MS mejora significativamente la detección de los componentes oxidados. Mediante esta técnica, las señales obtenidas se asignaron a di y triglicéridos, dímeros de los triglicéridos oxidados, triglicéridos oxidados y fragmentos de triglicéridos derivados de la β -escisión homolítica de la cadena (Schiller *et al.*, 2002a; Picariello *et al.*, 2009). En comparación con el aceite vegetal no calentado, se observa la presencia de nuevas señales en los espectros de masas del aceite calentado, por lo que estas señales se suelen asignar a productos de degradación, que aparecen por el calentamiento prolongado, principalmente producidos por la oxidación térmica de los triglicéridos y por rupturas homolíticas de la cadena carbonada de los aceites (Schiller *et al.*, 2002b).

Por lo tanto, el empleo de esta técnica permite evaluar la calidad de un aceite de una manera mucho más fácil, rápida y precisa que mediante las técnicas cromatográficas tradicionales, ya que no es necesaria una derivatización previa de la misma. Sin embargo, debido a la interferencia de las señales de la matriz, la aplicación de MALDI-TOF MS para identificar compuestos de baja masa molecular, esto es con relaciones m/z inferiores a 400 Da, como los FFA, FAMEs y monoglicéridos, que pueden estar presentes en pequeñas cantidades en las muestras de aceite, presenta muchas dificultades (Wiesman *et al.*, 2010).

La Figura IX.2 muestra un esquema del proceso de ionización/desorción por MALDI-TOF MS para las muestras de aceite y biodiesel. A la salida de la fuente de ionización, los iones formados, principalmente por aductos de sodio y/o potasio, son acelerados en un campo eléctrico. Este voltaje de aceleración (ΔV) proporciona a todos los iones la misma energía cinética y, por lo tanto, distintas velocidades en función de sus masas. Los iones más ligeros viajarán a mayor velocidad y llegarán antes al detector, el cual registra los tiempos de vuelo de los iones.

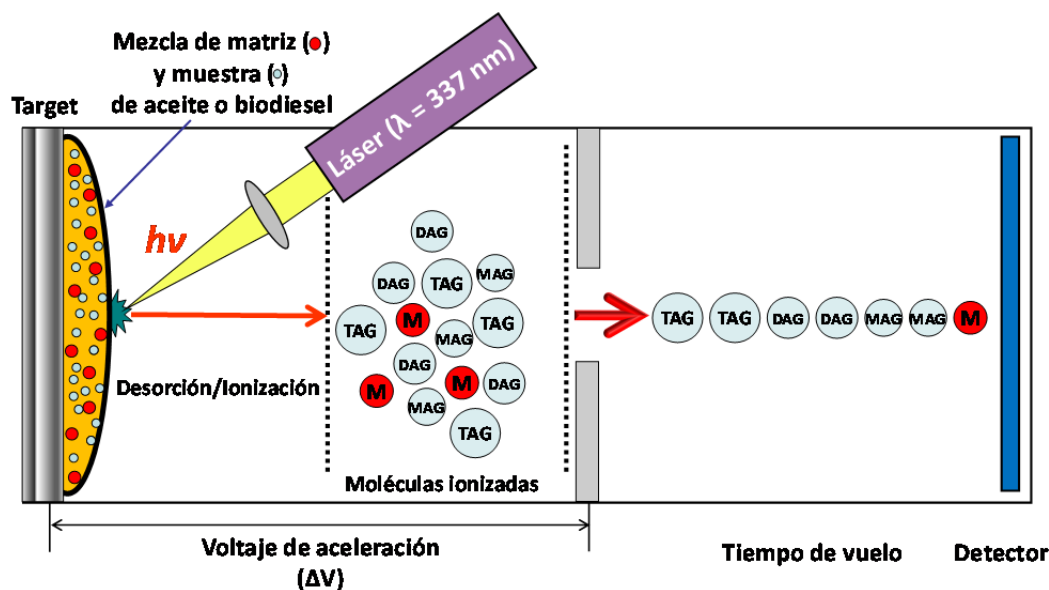


Figura IX.2.- Esquema del proceso de ionización/desorción por MALDI-TOF MS.

IX.1.1.4 Biodiesel

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, la MS no ha sido muy utilizada para caracterizar la composición del biodiesel. ESI-MS y EASI-MS han permitido establecer los espectros de masas característicos, huellas dactilares o *fingerprints* de muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites vegetales y grasas animales.

Catharino *et al.* (2007) estudiaron los *fingerprints* de muestras de biodiesel mediante ESI-MS en extractos acuosos/metanólicos. Cuando la ionización se hizo en modo negativo, los iones característicos se corresponden con FFA desprotonados, mientras que en modo positivo, los iones detectados son FAMES protonados. De esta forma, el biodiesel se puede caracterizar mediante la identificación del tipo de aceite y el alcohol empleados en la reacción de transesterificación. Asimismo, esta metodología permitió determinar la existencia de glicerina, mono-, di- y triglicéridos en el biodiesel, cuya presencia demuestra que la transesterificación ha sido incompleta. Por otra parte, la presencia de di- y triglicéridos en el biodiesel justifica la adulteración del mismo con aceites. Además, observaron la aparición de productos de degradación cuando la muestra de biodiesel se calienta a una temperatura de 120 °C en presencia de oxígeno, obteniéndose señales m/z que no aparecen en el biodiesel que no había sido calentado, por lo que se atribuyen a productos de oxidación del mismo. Esta metodología permite evaluar la calidad del biodiesel.

Eide *et al.* (2007) utilizaron ESI-MS combinada con un análisis de datos multivariante para determinar la composición en FAMES y FFA de muestras de biodiesel obtenidas a partir de diferentes tipos de aceites. Los resultados mostraron importantes diferencias entre los espectros de masas obtenidos en los modos de ionización positivo y negativo. Este método permitió identificar y cuantificar el contenido en biodiesel de mezclas diésel/biodiesel convencionales. La preparación de la muestra es mínima, ya que sólo es necesario diluirla en

diclorometano a una concentración de 2 mg mL⁻¹. El tiempo de análisis se reduce a 1 minuto, por lo que este método se puede utilizar en los laboratorios de análisis para el control de calidad y adulteración del biodiesel.

El acoplamiento EASI-MS ha sido empleado para determinar la composición de FAMES y FFA presentes en el biodiesel. De la misma forma que se utiliza para las muestras de aceite, esta técnica permite determinar la presencia de mono, di y triglicéridos que no hayan reaccionado durante la reacción de transesterificación. Así como para determinar la presencia de glicerina como principal subproducto del proceso de obtención del biodiesel, la cual podría originar la corrosión de las partes metálicas de los motores. De la misma manera, este método se puede utilizar para monitorizar la producción de biodiesel con rapidez y sin preparación previa de la muestra. Sólo es necesaria la utilización de una gota de biodiesel colocada en una superficie de papel sobre la que se pulveriza, a elevada velocidad, un disolvente en *spray*. Este proceso permitirá la ionización de la muestra (Alberici *et al.*, 2010).

No obstante, con la tecnología disponible en la actualidad, la interferencia de las señales de la matriz impide el empleo de MALDI-TOF MS para la caracterización de muestras de biodiesel, ya que dificulta la identificación de compuestos con relaciones *m/z* inferiores a 400 Da. Por este motivo, la técnica MALDI-TOF MS no se ha aplicado al análisis de los FAMES presentes en muestras de biodiesel, ya que las masas moleculares estas especies son inferiores a 400 Da. Sin embargo, MALDI-TOF MS se puede emplear como técnica de control de calidad del proceso de producción de biodiesel, ya que si la reacción de transesterificación es completa no deben aparecer relaciones *m/z* correspondientes a los triglicéridos en las muestras de biodiesel (Schiller *et al.*, 2002c; Wiesman *et al.*, 2010).

IX.2 Caracterización de las muestras de aceite mediante MALDI-TOF MS

IX.2.1 Preparación del *target* y de las muestras de aceite: Optimización

Como paso previo al desarrollo de una metodología analítica mediante MALDI-TOF MS que permita la caracterización de las muestras de aceite estudiadas, se realizaron una serie de experiencias previas con objeto de establecer las condiciones óptimas para la identificación de las especies presentes en las muestras. La preparación de la muestra y del *target* es un proceso esencial, por lo que se ensayaron diferentes condiciones de preparación del *target* para conseguir la ionización de los analitos presentes en las muestras y se probaron diferentes disolventes orgánicos para la dilución de las mismas.

La optimización de las condiciones experimentales se realizó con la muestra de aceite de oliva sin usar. Inicialmente, 1,0 µL de la muestra de aceite sin diluir y diluida en metanol a una concentración del 1,0 % (v/v) se depositaron sobre el *target*. En este caso, se trabaja con LDI por que no se utiliza matriz y el láser incide directamente sobre la muestra. De esta forma, los espectros de masas no presentan interferencias debidas a productos de ionización de la matriz, ya sea por sus señales características o por impurezas presentes en la misma, por lo

que se podrían identificar compuestos en el aceite con relaciones m/z inferiores, como di y triglicéridos (550 y 1000 Da). En la Tabla III.12 de la sección III.4.6 se presentan las condiciones instrumentales óptimas para el análisis de las muestras de aceite mediante MALDI-TOF MS. La Figura IX.3 muestra los espectros de masas obtenidos bajo las condiciones experimentales iniciales, anteriormente indicadas.

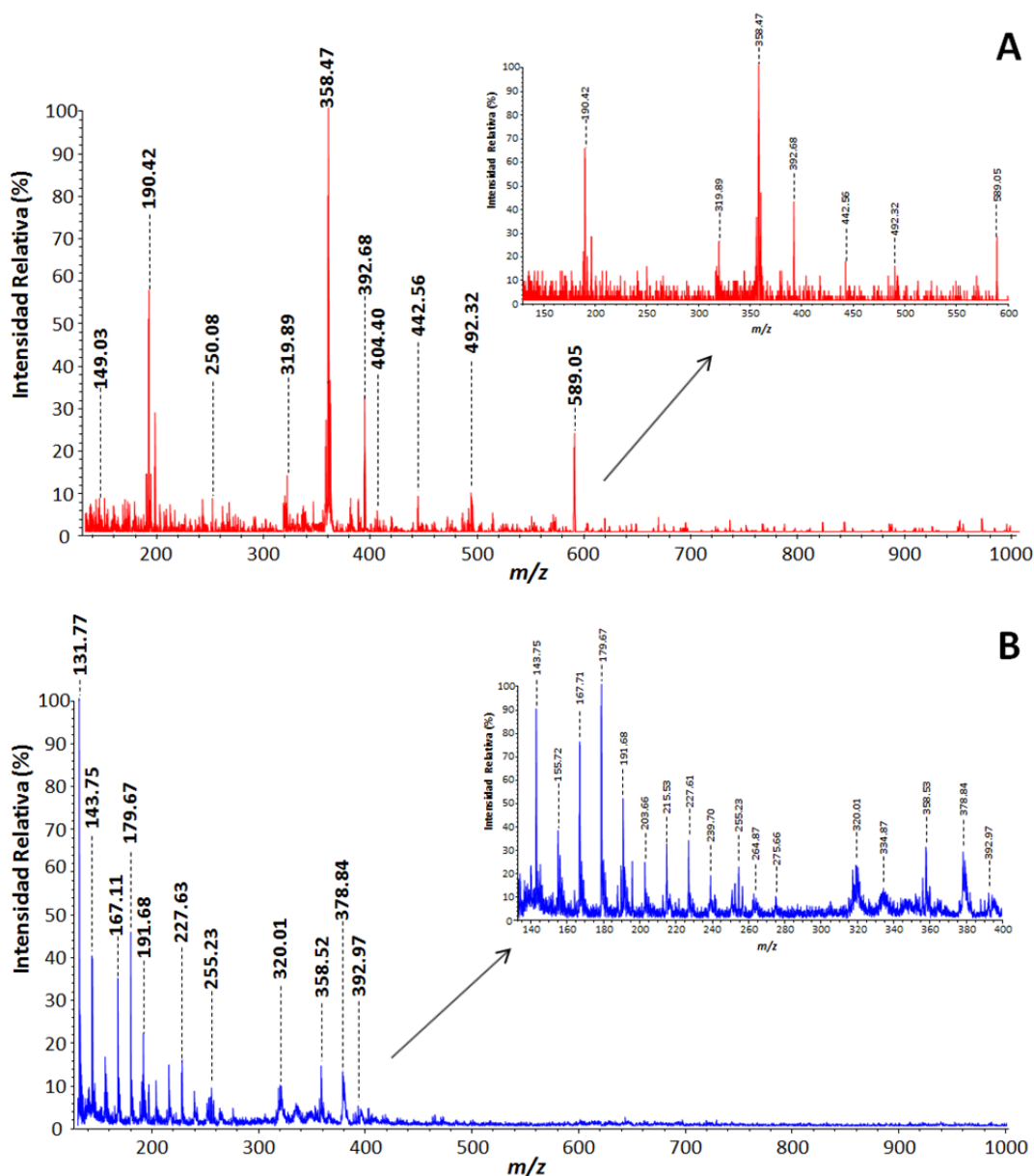


Figura IX.3.- Espectros de masas obtenidos mediante LDI-TOF MS, utilizando el *target* de acero inoxidable. (A) Espectro de la muestra de aceite de oliva sin diluir; (B) Espectro de la muestra de aceite diluida en metanol a una concentración del 1,0 % (v/v).

Como se puede observar en los espectros de masas de la Figura IX.3, sólo aparecen señales correspondientes a relaciones m/z inferiores a 600 Da que, según las m/z y las distribuciones isotópicas, pueden asignarse a mono- y diglicéridos presentes en la muestra de

aceite. La ausencia de señales para relaciones m/z superiores a 800 Da que se corresponden con la presencia de triglicéridos, permite concluir que la energía del láser no fue suficiente para conseguir la ionización completa de la muestra.

De acuerdo con la experiencia previa del grupo de investigación del Profesor Josef Havel (Universidad de Masaryk, Brno, República Checa), se ensayó el empleo de un *target* siliconado para evitar, en lo posible, que las impurezas procedentes de análisis previos pudieran aparecer como contaminación de los espectros de las muestras, ya que el procedimiento de lavado del *target* con agua, etanol, metanol y acetona y, finalmente, ultrasonidos durante 3 ó 4 horas, no siempre resulta de utilidad para la eliminación de los residuos procedentes de análisis previos (Houška *et al.*, 2009). Por este motivo, se cubrió la placa del MALDI con una fina capa de parafilm, evitando la formación de burbujas de aire sobre el *target*, que pueden falsear los resultados obtenidos.

En la Figura IX.4 se muestran los espectros de masas correspondientes al *target* recubierto con parafilm sin muestra (Figura IX.4.A), con la muestra de aceite de oliva sin diluir (Figura IX.4.B) y con la muestra de aceite de oliva diluida en metanol (1,0 μL de aceite con 100,0 μL de metanol (Figura IX.4.C). Se depositó 1,0 μL de cada muestra sobre diferentes *spot* del *target*, y los espectros de masas se registraron siguiendo las condiciones instrumentales recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6. Se realizaron diferentes análisis empleando varias energías del láser para determinar cuál era la energía óptima para la ionización de los analitos presentes en la muestra. La energía mínima de ionización que da lugar a una señal en el espectro (*threshold*) fue superior a 150 u.a. Por debajo de este valor no se observó la ionización de la muestra.

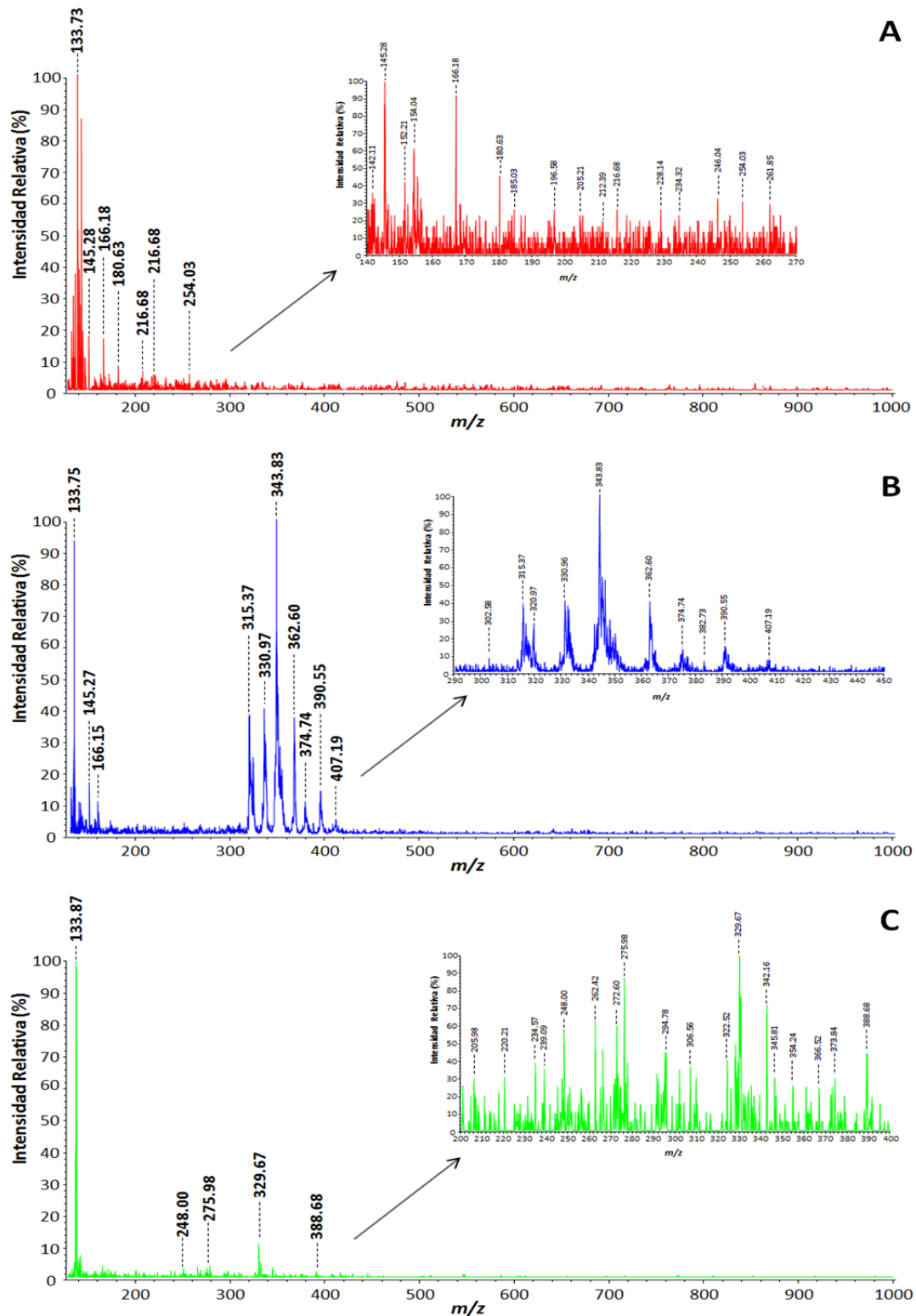


Figura IX.4.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS empleando un target siliconado. (A) En ausencia de muestra; (B) Muestra de aceite de oliva sin diluir; (C) Muestra de aceite de oliva diluida en metanol. Condiciones: Modo lineal positivo y energía del láser de 160 u.a.

Como puede apreciarse en la Figura IX.4.A, el espectro de masas correspondiente al *target* recubierto de silicona proporcionó un conjunto de señales m/z inferiores a 300 Da. Por lo que, en principio, su empleo sería adecuado para llevar a cabo la determinación de di- y triglicéridos en muestras de aceite dado que no aparecen señales en el intervalo de

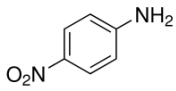
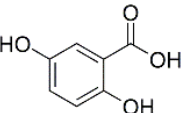
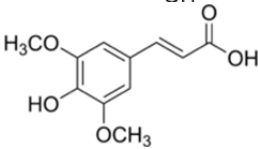
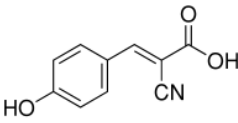
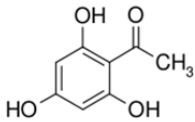
relaciones m/z de estos compuestos ($500 \leq m/z \leq 1000$ Da). Sin embargo, como puede observarse en las Figuras IX.4.B y IX.4.C, este modo de preparación del *target* no permitió la identificación de ningún compuesto en el intervalo m/z donde aparecerían las señales de los di y triglicéridos, posiblemente debido a que no se produjo la correcta ionización de los analitos presentes en la muestra, a pesar de emplear elevadas energía del láser. En la Figura IX.4.B el espectro de masas presenta un conjunto de señales entre las m/z comprendidas entre 300 y 400 Da que se pueden atribuir a algunos compuestos minoritarios, como monoglicéridos, presentes en la muestra de aceite, lo que está de acuerdo con la bibliografía consultada (Holčapek *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2002c; Knothe, 2005). Por lo tanto, se descartó la utilización de un *target* siliconado ya que no era adecuado para la determinación de los compuestos mayoritarios presentes en los aceites (di- y triglicéridos).

IX.2.2 Optimización de la matriz

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que era necesario emplear una matriz para mejorar la ionización de la muestra de aceite. El empleo de una matriz implica la disolución de ésta en un disolvente, su depósito sobre el *target* y, la posterior evaporación del disolvente. A continuación, la muestra de aceite diluida se deposita sobre la matriz. Seguidamente, el disolvente de la muestra se elimina de la mezcla por secado de la misma bajo una corriente de aire a temperatura ambiente, originando unos cristales formados por las moléculas de la matriz impregnadas con la muestra de aceite. Por último, se procede a la aplicación de pulsos intensos y cortos del láser sobre dicho sólido.

La matriz siempre da lugar a las señales más intensas en el espectro de masas, especialmente en la región cercana a los valores de m/z de su ion molecular preferente. Por lo tanto, el papel de la matriz es activo durante todo el proceso, al ser la responsable de la absorción de la energía, induciendo su propia ionización/desorción y la de los analitos presentes en la muestra estudiada. En la Tabla IX.1 se recogen las matrices más empleadas en MALDI (Ayorinde *et al.*, 1999a; Schiller *et al.*, 1999; Guyon *et al.*, 2003; Stübiger *et al.*, 2007; Saraiva *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2010; Teuber *et al.*, 2010; Wiesman *et al.*, 2010).

Tabla IX.1.- Matrices más empleadas en MALDI-TOF MS.

Compuesto	Acrónimo	Fórmula	P.M. (g mol ⁻¹)	Estructura química
para-nitroanilina	PNA	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	138,04	
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	DHB	C ₇ H ₆ O ₄	154,03	
Ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico	SA	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,07	
Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico	CHCA	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189,04	
2,4,6-trihidroxi-acetofenona	THA	C ₈ H ₈ O ₄	168,04	

La elección de una matriz apropiada es de vital importancia para generar resultados de calidad, ya que la intensidad de las señales en el espectro de masas varía en función de la matriz empleada. La irradiación de la matriz con el láser puede originar reacciones de dimerización que podrían dar lugar a la formación de aductos moleculares solapándose con las señales de los analitos de la muestra (Teuber *et al.*, 2010). La matriz más empleada en MALDI para el análisis de triglicéridos es el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ya que proporciona los mejores resultados en cuanto a reproducibilidad y sensibilidad (Ayorinde *et al.*, 1999a, 1999b; Schiller *et al.*, 1999,2002a; Fuchs *et al.*, 2009).

Por lo tanto, se decidió emplear como matriz una disolución saturada de DHB (10,0 mg en 1,0 mL de acetona). Se tomaron 1,0 µL de dicha matriz y se depositaron en el *target*, evaporándose el disolvente bajo una corriente de aire a temperatura ambiente. A continuación, se depositó sobre la matriz 1,0 µL de la muestra de aceite sin diluir y 1,0 µL de la muestra diluida en metanol al 1 % (v/v), evaporándose el metanol según el procedimiento descrito. Durante el proceso de evaporación tiene lugar la co-cristalización del aceite con la matriz. Finalmente, el *target* se colocó en el interior del espectrómetro de MALDI-TOF MS. En la Figura IX.5 se presentan los espectros de masas de la matriz DHB en ausencia de muestra (Figura IX.5.A), de una muestra de aceite de oliva sin diluir con la matriz (Figura IX.5.B) y de la misma muestra diluida en metanol con la matriz (Figura IX.5.C), obtenidos en las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12.

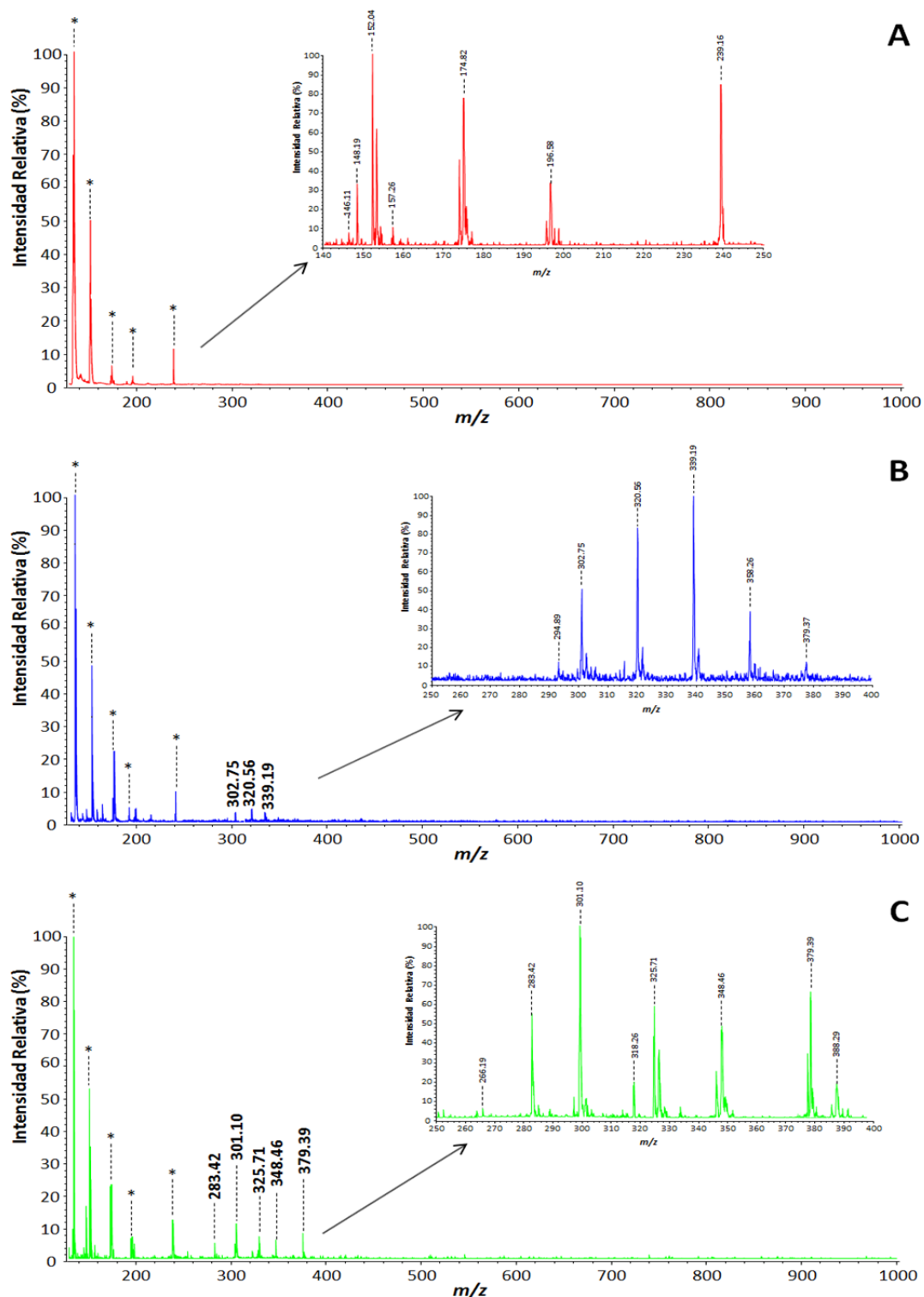


Figura IX.5.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS. (A) Espectro de la matriz (DHB); (B) Espectro de la muestra de aceite de oliva sin diluir con DHB; (C) Espectro de la muestra de aceite de oliva diluida en metanol a una concentración del 1,0 % (v/v) con DHB. (* Señales correspondientes a la matriz).

Como se observa en la Figura IX.5.A, la matriz genera un conjunto de señales entre 0 y 250 Da, las cuales podrían solaparse con las originadas por los analitos de la muestra con la misma masa molecular, por lo que no sería posible determinar los compuestos presentes en las muestras en este intervalo de relaciones m/z . En el espectro de la muestra de aceite de

oliva sin diluir (Figura IX.5.B), se observan además un grupo de señales m/z en el intervalo comprendido entre 300 y 350 Da, cuya intensidad relativa es muy pequeña. Por último, se observa que la dilución de la muestra con metanol (Figura IX.5.C) permite una ionización de los analitos más eficaz. Aparecen un conjunto de señales en el intervalo de $300 \leq m/z \leq 400$ Da, pero aún no se ha conseguido ionizar aquellas especies que de forma mayoritaria están presentes en las muestras de aceite (di y triglicéridos en el intervalo de $500 \leq m/z \leq 1100$ Da).

Asimismo, los mejores resultados se obtuvieron cuando se realizó la dilución de las muestras de aceite con un disolvente orgánico. Con objeto de encontrar el disolvente de la muestra de aceite que permitiera mejorar los resultados, se realizaron varios ensayos empleando DHB como matriz, y acetonitrilo, cloroformo, n-hexano y metanol como disolventes. El disolvente que proporcionó los mejores resultados fue el cloroformo, ya que permitió la detección de numerosos compuestos presentes en las muestras y no aportaba señales que pudiesen interferir a m/z superiores a 400 Da. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se determinó que la muestra de aceite se debía diluir en cloroformo a una concentración final de 0,4 % (v/v).

Parece evidente que debido a la baja polaridad que presentan los aceites, es necesario la utilización de una matriz que permita facilitar la ionización de la muestra para conseguir detectar las especies mayoritarias (Teuber *et al.*, 2010). Aun así, no ha sido posible obtener las relaciones m/z correspondientes a los di- y triglicéridos, que son la especies mayoritarias en este tipo de muestras.

Por esta razón se planteó la necesidad de utilizar un reactivo cationizante, como el ácido trifluoroacético (TFA), para aumentar la polaridad de la muestra de aceite, mejorando así su ionización (Schiller *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2009a, 2009b). Se realizó la optimización de la matriz utilizando 10,0 mg de DHB disueltos en 1,0 mL de acetona y se ensayaron dos concentraciones de TFA (0,25 % y 0,50 %), con objeto de determinar qué concentración de TFA permitía obtener una mejor ionización de la muestra sin aportar nuevas señales en la región de relaciones m/z comprendidas entre 500 y 1000 Da. En la Figura IX.6 se muestran los espectros de masas obtenidos para la matriz con 0,25 % (Figura IX.6.A) y 0,50 % (Figura IX.6.B) de TFA, en ausencia de muestra de aceite, bajo las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

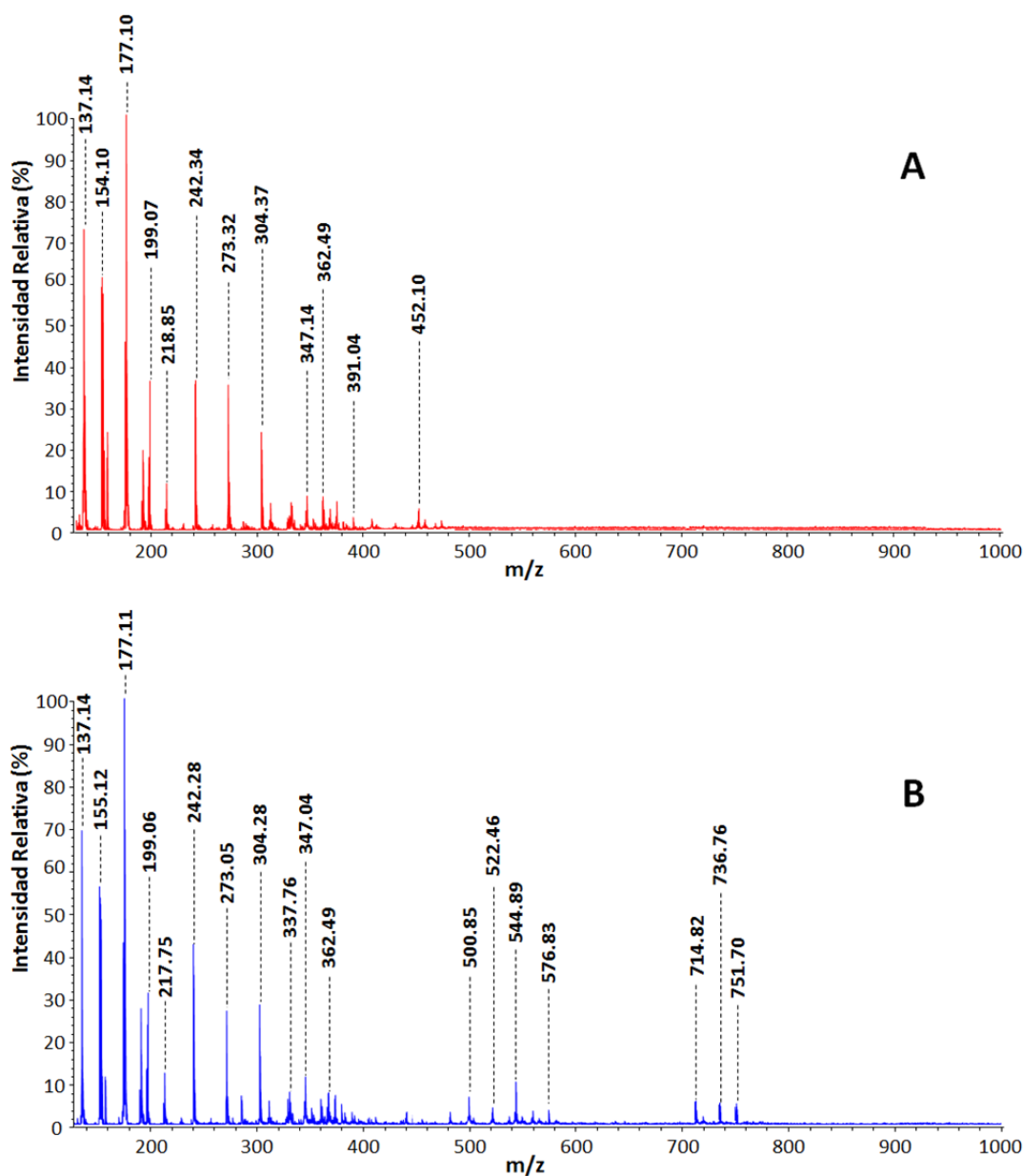


Figura IX.6.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS, en ausencia de muestra.
 (A) Espectro de la matriz (DHB) disuelta en acetona, con 0,25 % de TFA;
 (B) Espectro de la matriz (DHB) disuelta en acetona, con 0,50 % de TFA.

Como se observa en la Figura IX.6.A, el espectro de la matriz (DHB) con un 0,25 % de TFA presenta un conjunto de señales para relaciones m/z inferiores a 500 Da, mientras que cuando se emplea la matriz con un 0,50 % de TFA (Figura IX.6.B) se obtienen señales para relaciones m/z inferiores a 775 Da. Por lo tanto, con objeto de reducir en lo posible las interferencias espectrales procedentes de la matriz, se decidió emplear una matriz de DHB disuelta en acetona, con un 0,25 % de TFA, para llevar a cabo la caracterización de las muestras de aceite.

IX.2.3 Fingerprints o huellas dactilares de las muestras de aceite

IX.2.3.1 Fingerprints o huellas dactilares de las muestras de aceite de oliva sin usar

En la Figura IX.7 se muestra un ejemplo de un espectro de masas, a partir de relaciones m/z superiores a 500 Da, obtenido al analizar una muestra de aceite de oliva sin usar empleando las condiciones experimentales optimizadas de la matriz descritas en el apartado anterior y siguiendo las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

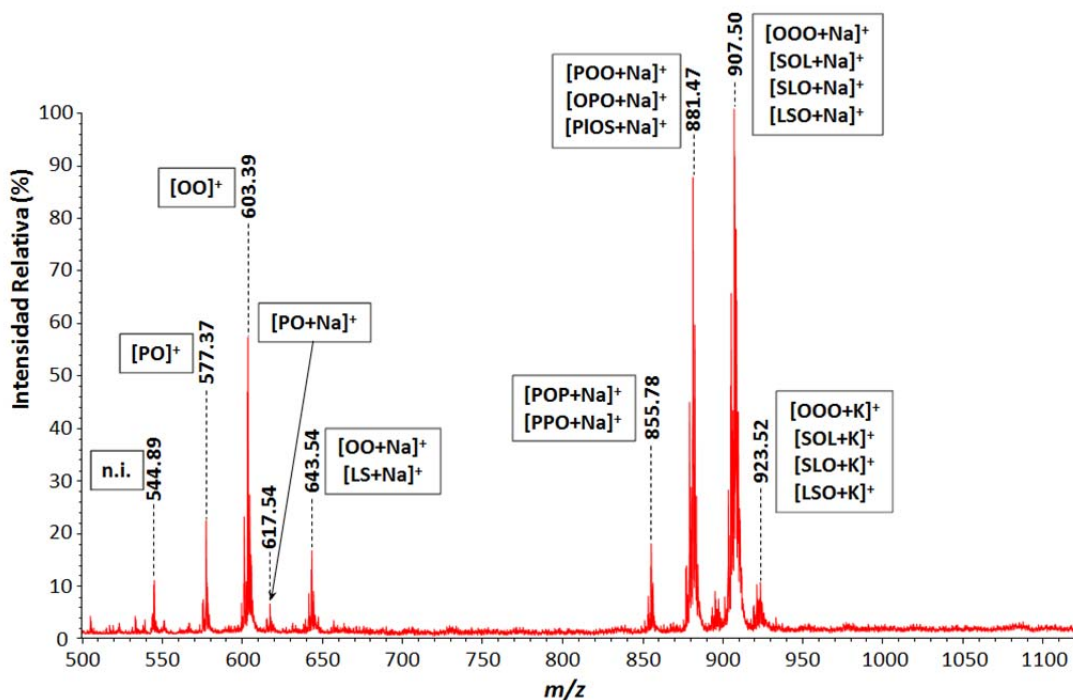


Figura IX.7.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para una muestra de aceite de oliva sin usar, diluida en cloroformo a un concentración de 0,4 % (v/v), empleando como matriz una disolución saturada de DHB en acetona con un 0,25 % de TFA, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

Como se puede apreciar en la Figura IX.7, el empleo como matriz de una disolución saturada de DHB en acetona con 0,25 % de TFA permitió obtener la caracterización de la muestra de aceite de oliva sin usar, observando las relaciones m/z correspondientes a las especies mayoritarias de la muestra de aceite (di y triglicéridos). La presencia de este porcentaje de TFA en la matriz facilita la ionización de la muestra de aceite debido a que proporciona un aumento de la solubilidad de los lípidos presentes en las mismas y de su polaridad (Fuchs *et al.*, 2009a, 2009b, 2010).

La asignación de las señales a las relaciones m/z observadas en los espectros correspondientes a las muestras de aceite se realizó de acuerdo con las masas calculadas a partir de las estructuras de los analitos presentes y mediante el uso de las correspondientes distribuciones isotópicas, no siendo posible la diferenciación entre isómeros isobáricos mediante la metodología empleada. Los triglicéridos aparecen como aductos sodiados, en el

intervalo de m/z comprendido entre 800 y 1000 Da, y en menor proporción, como aductos de potasio, aunque se observa que las intensidades relativas de las señales obtenidas son inferiores para estos últimos. La razón por la cual las moléculas de triglicéridos aparecen como aductos de sodio o de potasio se debe a la presencia de estos metales alcalinos en las muestras de aceite, como se determinó en el Capítulo VIII, y por su tendencia a formar aductos con estos metales en las condiciones de trabajo. También se identificaron diglicéridos sodiados en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 600 y 660 Da. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los obtenidos por varios autores de la bibliografía (Ayorinde *et al.*, 1999a, 1999b; Jakab *et al.*, 2002; Lay *et al.*, 2006; Gidden *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2009a; 2010; Picariello *et al.*, 2009).

Además de las moléculas formadas por aductos de sodio y potasio, los espectros de masas presentan fragmentos iónicos característicos, como las señales a m/z comprendidas entre 540 y 650 Da, que se corresponden con fragmentos iónicos de los triglicéridos. En la Figura IX.8 se muestra un esquema de las posibles fragmentaciones que pueden sufrir los triglicéridos al someterse a ionización mediante MALDI. Estos iones se forman por la pérdida de un carboxilato sódico ($R_i\text{COONa}$) a partir de la molécula de triglicérido sodiada $[\text{TAG}+\text{Na}]^+$, originando un diglicérido iónico (Fragmento 1). Otros fragmentos iónicos presentes en los espectros de masas se forman por la pérdida de un ión acilio $[\text{R}_i\text{CO}]^+$ a partir del fragmento anterior, obteniéndose un monoglicérido iónico. Sin embargo, no es posible observar este último fragmento iónico en los espectros de masas, ya que su relación m/z es inferior a 400 Da.

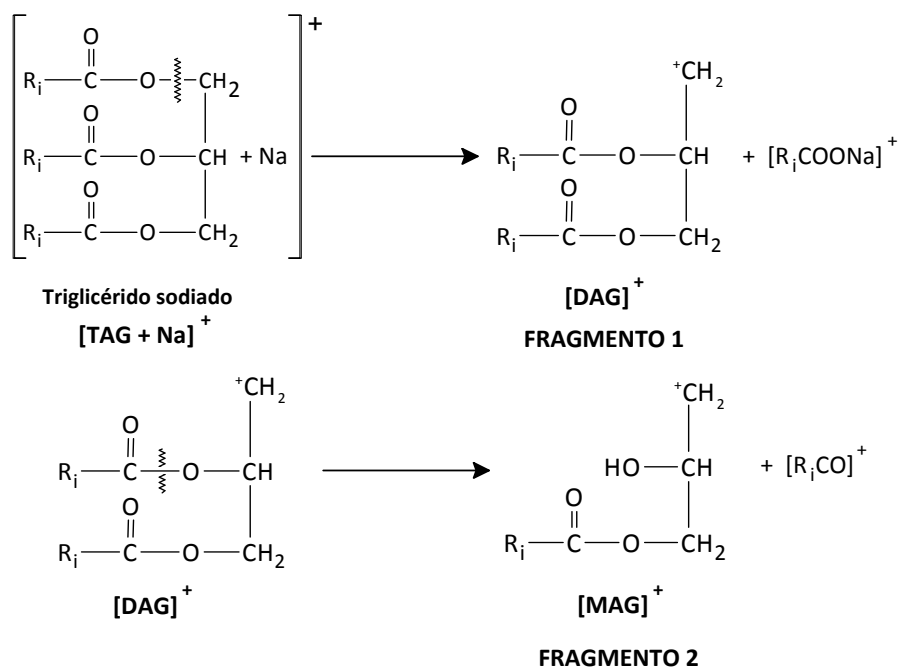


Figura IX.8.- Fragmentaciones de los triglicéridos obtenidos por MALDI en modo de ionización positivo.

En las Tablas IX.2 y IX.3 se muestran los pesos moleculares y los nombres de los diglicéridos y triglicéridos que han sido identificados en la presente Memoria.

Tabla IX.2.- Peso molecular, nombre y acrónimo de los diglicéridos estudiados.

P.M. (g mol ⁻¹)	Acrónimo	Compuesto
614,51	LLn	1-linoleoil-2-linolenonil-glicerol
616,95	LL	1,2-dilinoleina
618,51	OL	1-oleoil-2-linoleoil-glicerol
	LnS	1-linolenonil-2-estearoil-glicerol
620,99	OO	1,2-dioleina
	LS	1-linoleoil-2-estearoil-glicerol
592,54	PL	1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol
594,55	PO	1-palmitoil-2-oleoil-glicerol
625,02	SS	1,2-diestearina

Tabla IX.3.- Peso molecular, nombre y acrónimo de los triglicéridos estudiados.

P.M. (g mol ⁻¹)	Acrónimo	Compuesto	P.M. (g mol ⁻¹)	Acrónimo	Compuesto
828,72	PPLn	1,2-dipalmitoil-3-linoleoil-glicerol	858,77	POO	1-palmitoil-2,3-dioleoil-glicerol
	PLnP	1-palmitoil-2-linoleoil-3-palmitoil-glicerol		OPO	1-oleoil-2-palmitoil-3-oleoil-glicerol
830,74	PPL	1,2-dipalmitoil-3-linoleoil-glicerol	860,78	POS	1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoil-glicerol
	PLP	1-palmitoil-2-linoleoil-3-palmitoil-glicerol		PSO	1-palmitoil-2-estearoil-3-oleoil-glicerol
832,75	PPO	1,2-dipalmitoil-3-oleoil-glicerol		SPO	1-estearoil-2-palmitoil-3-oleoil-glicerol
	POP	1-palmitoil-2-oleoil-3-palmitoil-glicerol	862,80	PSS	1-palmitoil-2,3-diestearoil-glicerol
834,77	PPS	1,2-dipalmitoil-3-estearoil-glicerol		SPS	1-estearoil-2-palmitoil-3-estearoil-glicerol
		PSP	1-palmitoil-2-estearoil-3-estearoil-glicerol	LnLnLn	Trilinolenina
852,74	PLLn	1-palmitoil-2-linoleoil-3-linolenonil-glicerol	874,60	LnLLn	1-linolenonil-2-linoleoil-3-linolenonil-glicerol
	PLnL	1-palmitoil-2-linolenonil-3-linoleoil-glicerol		LnLnL	1,2-dilinolenonil-3-linoleoil-glicerol
854,72	PIOL	1-palmitoleil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol	876,72	LLLn	1,2-dilinoleoil-3-linolenonil-glicerol
854,74	PLL	1-palmitoil-2,3-linoleoil-glicerol		LLnL	1-linoleoil-2-linolenonil-3-linoleoil-glicerol
	LPL	1-linoleoil-2-palmitoil-3-linoleoil-glicerol	LLL	Trilinoleina	
	POLn	1-palmitoil-2-oleoil-3-linolenonil-glicerol	878,73	OLLn	1-oleoil-2-linoleoil-3-linolenonil-glicerol
856,75	PLO	1-palmitoil-2-linoleoil-3-oleoil-glicerol		OLnL	1-oleoil-2-linolenonil-3-linoleoil-glicerol
	POL	1-palmitoil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol		LOLn	1-linoleoil-2-oleoil-3-linolenonil-glicerol
	OPL	1-oleoil-2-palmitoil-3-linoleoil-glicerol			

Cont. Tabla IX.3.- Peso molecular, nombre y acrónimo de los triglicéridos estudiados.

P.M. (g mol ⁻¹)	Acrónimo	Compuesto	P.M. (g mol ⁻¹)	Acrónimo	Compuesto	
880,75	SLLn	1-estearoil-2-linoleoil-3-linolenonil-glicerol	884,80	OOO	Trioleina	
	SLnL	1-estearoil-2-linolenonil-3-linoleoil-glicerol	886,80	OSO	1-oleoil-2-estearoil-3-oleoil-glicerol	
	LOL	1-linoleoil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol		SOO	1-estearoil-2,3-dioleoil-glicerol	
	OLL	1-oleoil-2,3-dilinoleoil-glicerol		SSL	1,2-diestearoil-3-oleoil-glicerol	
	882,77	OLnO	1-oleoil-2-linolenonil-3-oleoil-glicerol	888,81	SLS	1-estearoil-2-linoleoil-3-oleoil-glicerol
		OOLn	1,2-dioleoil-3-linolenonil-glicerol		OSO	1-estearoil-2-oleoil-3-estearoil-glicerol
		LSLn	1-linoleoil-2-estearoil-3-linolenonil-glicerol	SSO	1,2-diestearoil-3-oleoil-glicerol	
884,78	LLS	1,2-dilinoleoil-3-estearoil-glicerol	890,73	SSS	Triestearina	
	LSL	1-linoleoil-2-estearoil-3-linoleoil-glicerol	910,80	ALL	1-araquidonoil-2,3-dilinoleoil-glicerol	
	OOL	1,2-dioleoil-3-linoleoil-glicerol	912,81	AOL	1-araquidonoil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol	
	OLO	1-oleoil-2-linoleoil-3-oleoil-glicerol	914,83	ASL	1-araquidonoil-2-estearoil-3-linoleoil-glicerol	
884,78	LSO	1-linoleoil-2-estearoil-3-oleoil-glicerol	914,83	OOA	1,2-dioleoil-3-araquidonoil-glicerol	
	SOL	1-estearoil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol	916,84	ASO	1-araquidonoil-2-estearoil-3-oleoil-glicerol	
	SLO	1-estearoil-2-linoleoil-3-oleoil-glicerol				

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante GC-FID (Capítulo V), la muestra de aceite de oliva sin usar está formada mayoritariamente por los ácidos grasos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. A partir de estos resultados, de las distribuciones isotópicas, de la bibliografía consultada, y teniendo en cuenta las posibles combinaciones de di y triglicéridos que se pueden formar a partir de estos ácidos grasos, se han asignado las relaciones m/z observadas en los espectros a diferentes compuestos (Ayorinde *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c; Calvano *et al.*, 2005; Chapagain *et al.*, 2009b; Saraiva *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2010; Wiesman *et al.*, 2010). Sin embargo, para poder confirmar la asignación realizada de forma inequívoca, sería necesario llevar a cabo un análisis mediante, por ejemplo, MALDI-TOF MS/MS.

En la Figura IX.9 se muestra la zona del espectro de masas correspondiente a las relaciones m/z de los fragmentos iónicos y de los diglicéridos, en el intervalo comprendido entre 540 y 660 Da, mientras que en la Figura IX.10 se muestra la zona del espectro de masas correspondiente a los triglicéridos, en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 850 y 950 Da, en los que se observan todas las señales de las especies identificadas en la muestra de aceite de oliva sin usar.

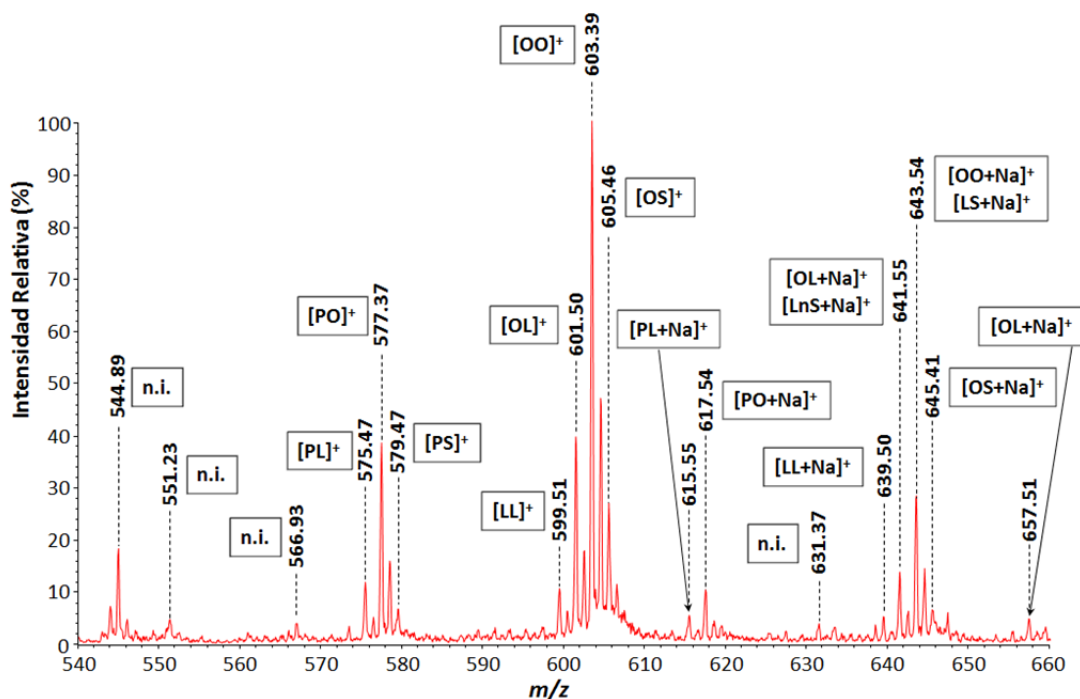


Figura IX.9.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva sin usar, en el intervalo de $540 \leq m/z \leq 660$ Da, correspondiente a los fragmentos iónicos y los diglicéridos, formados como aductos de sodio y/o potasio, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

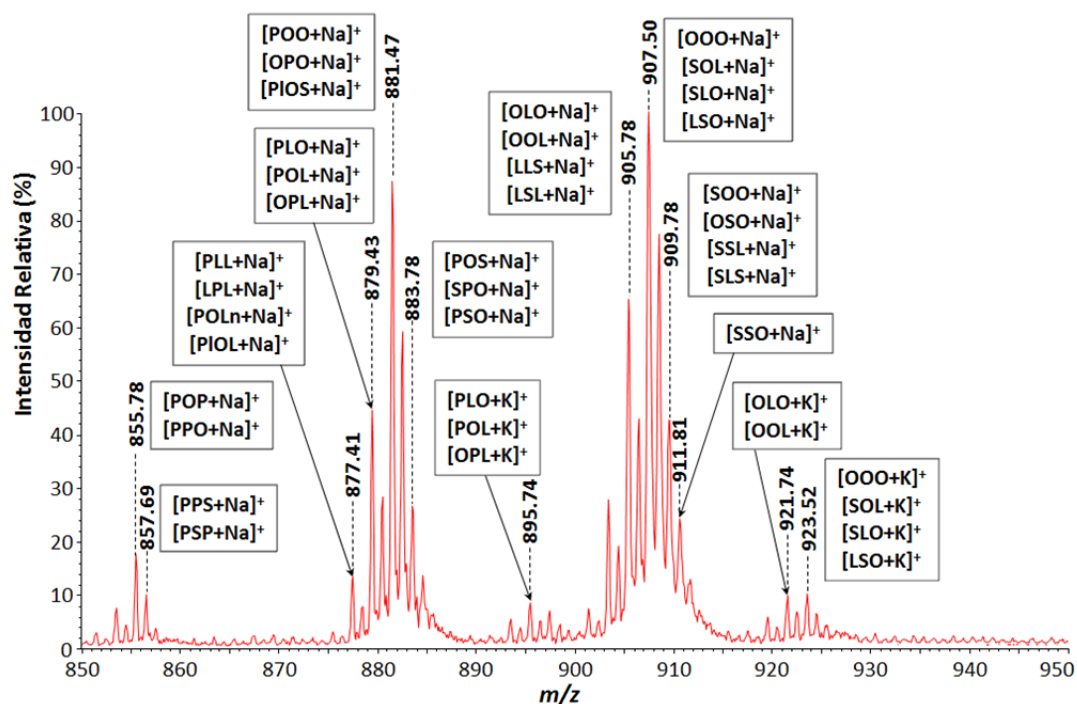


Figura IX.10.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva sin usar, en el intervalo de $850 \leq m/z \leq 950$ Da, correspondiente a los triglicéridos formados como aductos de sodio y/o potasio, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias.

En el espectro de masas del aceite de oliva sin usar (Figura IX.7 y IX.10), cabe destacar la presencia de una señal predominante a una m/z 907,50 Da. Esta señal se corresponde con diferentes aductos sodiados $[M+Na]^+$ de los triglicéridos, pero de acuerdo con el estudio de las distribuciones isotópicas realizado, se puede asignar a la trioleína (OOO), que es el triglicérido más abundante en el aceite de oliva (Picariello *et al.*, 2009). Otra de las señales con mayor intensidad se encuentra a una m/z 881,47 Da, la cual se puede atribuir a varios triglicéridos (POO, OPO, PIOS), aunque según las distribuciones isotópicas obtenidas se puede asignar al 1-palmitoil-2,3-dioleoil-glicerol (POO). La señal correspondiente a una m/z 855,78 Da se puede asignar a dos isómeros isobáricos de los triglicéridos, el 1,2-dipalmitoil-3-oleoil-glicerol (PPO) y el 1-palmitoil-2-oleoil-3-palmitoil-glicerol (POP). Los resultados obtenidos mediante las correspondientes distribuciones isotópicas están de acuerdo con los datos obtenidos por otros autores en la bibliografía (Ayorinde *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c; Calvano *et al.*, 2005).

En la Tabla IX.4 se recogen las relaciones m/z , tanto teóricas como las observadas experimentalmente (referidas a datos monoisotópicos), de los fragmentos iónicos de los triglicéridos y los diglicéridos sodiados, mientras que en la Tabla IX.5 se muestran los triglicéridos a los que han sido asignados las relaciones m/z observadas en el espectro de MALDI-TOF MS obtenido para la muestra de aceite de oliva sin usar.

Tabla IX.4.- Relaciones m/z teóricas y observadas en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva sin usar y asignaciones a diglicéridos y a fragmentos iónicos de los triglicéridos.

m/z		Fragmentos iónicos de triglicéridos	m/z		Diglicéridos
Observada	Teórica		Observada	Teórica	
544,89	-	n.i.	615,55	615,53	[PL+Na] ⁺
551,23	-	n.i.	617,54	617,52	[PO+Na] ⁺
566,93	-	n.i.	631,37	-	n.i.
573,35	-	n.i.	637,50	637,48	[LLn+Na] ⁺
575,47	575,49	[PL] ⁺	639,50	639,49	[LL+Na] ⁺
577,37	577,41	[PO] ⁺	641,55	641,53	[OL+Na] ⁺
579,47	579,49	[PS] ⁺			[LnS+Na] ⁺
597,52	597,54	[LLn] ⁺	643,54	643,53	[OO+Na] ⁺
599,51	599,49	[LL] ⁺			[LS+Na] ⁺
601,50	601,52	[OL] ⁺	645,41	645,55	[OS+Na] ⁺
603,39	603,41	[OO] ⁺	647,51	647,56	[SS+Na] ⁺
605,46	605,48	[OS] ⁺	657,51	657,53	[OL+K] ⁺
			659,54	659,50	[OO+K] ⁺
			685,28	-	n.i.

n.i. = no identificado

Tabla IX.5.- Relaciones m/z teóricas y observadas en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva sin usar y asignaciones a triglicéridos.

m/z		Triglicéridos	m/z		Triglicéridos
Observada	Teórica		Observada	Teórica	
851,69	851,71	[PPPI+Na] ⁺	895,74	895,68	[LnLnLn+Na] ⁺
		[PIPI+Na] ⁺			[PLO+K] ⁺
853,73	853,72	[PPL+Na] ⁺	895,74	895,71	[POL+K] ⁺
		[PLP+Na] ⁺			[OPL+K] ⁺
855,78	855,74	[POP+Na] ⁺	897,75	897,69	[LnLnL+Na] ⁺
		[PPO+Na] ⁺			[LnLLn+Na] ⁺
857,69	857,76	[PPS+Na] ⁺	897,75	897,73	[POO+K] ⁺
		[PSP+Na] ⁺			[OPO+K] ⁺
871,18	871,71	[POP+K] ⁺	899,74	899,71	[LLLn+Na] ⁺
		[PPO+K] ⁺			[LLnL+Na] ⁺
875,72	875,76	[PLnL+Na] ⁺	899,74	899,74	[POS+K] ⁺
		[PLLn+Na] ⁺			[SPO+K] ⁺
877,41	877,72	[PLL+Na] ⁺	901,78	901,73	[PSO+K] ⁺
		[LPL+Na] ⁺			[LLL+Na] ⁺
		[POLn+Na] ⁺			[OLLn+Na] ⁺
879,43	879,74	[PIOL+Na] ⁺	903,79	903,74	[OLnL+Na] ⁺
		[PLO+Na] ⁺			[LOLn+Na] ⁺
		[POL+Na] ⁺			[OLL+Na] ⁺
881,47	881,76	[OPL+Na] ⁺	903,79	903,74	[LOL+Na] ⁺
		[POO+Na] ⁺			[SLLn+Na] ⁺
		[OPO+Na] ⁺			[LSLn+Na] ⁺
883,78	883,77	[PIOS+Na] ⁺	905,78	905,76	[SLnL+Na] ⁺
		[POS+Na] ⁺			[OOLn+Na] ⁺
		[SPO+Na] ⁺			[OLnO+Na] ⁺
885,79	885,79	[PSO+Na] ⁺	905,78	905,76	[OLO+Na] ⁺
		[PSS+Na] ⁺			[OOL+Na] ⁺
893,78	893,70	[SPS+Na] ⁺			[LLS+Na] ⁺
		[PLL+K] ⁺			[LSL+Na] ⁺
		[POLn+K] ⁺			

Cont. Tabla IX.5.- Relaciones m/z teóricas y observadas en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva sin usar y asignaciones a triglicéridos.

m/z		Triglicéridos	m/z		Triglicéridos
Observada	Teórica		Observada	Teórica	
907,50	907,77	[OOO+Na] ⁺	919,76	919,71	[OLL+K] ⁺
		[SOL+Na] ⁺			[LOL+K] ⁺
		[SLO+Na] ⁺			[SLLn+K] ⁺
		[LSO+Na] ⁺			[LSLn+K] ⁺
909,78	909,79	[SOO+Na] ⁺	921,74	921,73	[SLnL+K] ⁺
		[OSO+Na] ⁺			[OOLn+K] ⁺
		[SSL+Na] ⁺			[OLnO+K] ⁺
		[SLS+Na] ⁺			[OLO+K] ⁺
911,81	911,82	[SSO+Na] ⁺			[OOL+K] ⁺
913,82	913,82	[SSS+Na] ⁺	923,52	923,74	[OOO+K] ⁺
915,58	915,72	[LLLn+Na] ⁺			[SOL+K] ⁺
917,75	917,70	[LLL+K] ⁺			[SLO+K] ⁺
		[OLLn+K] ⁺			[LSO+K] ⁺
		[OLnL+K] ⁺	[SOO+K] ⁺		
		[LOLn+K] ⁺	[OSO+K] ⁺		
			925,75	925,76	

De acuerdo con las asignaciones realizadas, se han podido identificar una serie de fragmentos iónicos correspondientes a la escisión de los triglicéridos. La composición de estos fragmentos iónicos está de acuerdo con los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva (palmítico, linoleico, linolénico, esteárico y oleico). De igual forma, en el espectro de masas obtenido se observa la presencia de di y triglicéridos formados por combinaciones de los diferentes ácidos grasos existentes en la muestra de aceite de oliva estudiada, apareciendo como aductos de sodio y/o de potasio.

Las asignaciones realizadas se pueden confirmar mediante el estudio de las distribuciones isotópicas correspondiente a los posibles iones presentes para cada conjunto de relaciones m/z . El *software* Kratos Kompact V5.2.0., que controla al espectrómetro de MALDI-TOF MS, permite diseñar un modelo teórico de las señales obtenidas a partir de las fórmulas químicas de las diferentes especies identificadas. A modo de ejemplo en la Figura IX.11 muestra el espectro de masas experimental (Figura IX.11.B) obtenido para las relaciones m/z comprendidas entre 900 y 918 Da y la distribución isotópica (Figura IX.11.B) obtenida mediante el *software* de un la mezcla de triglicéridos LLL, LLO, LOO, OOO, OOS y SSO.

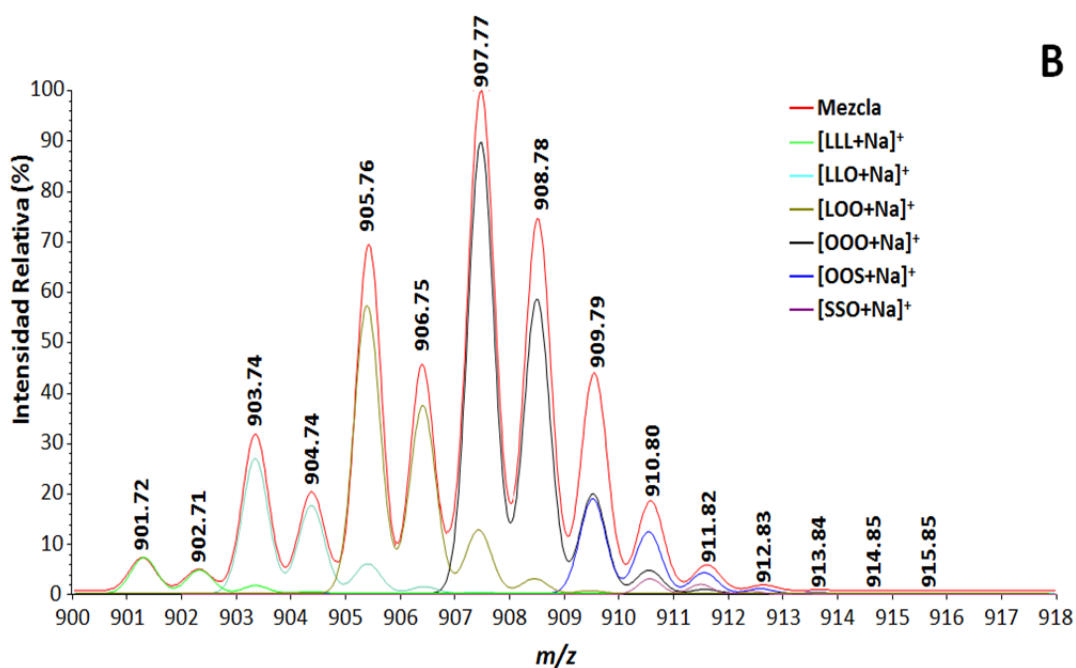
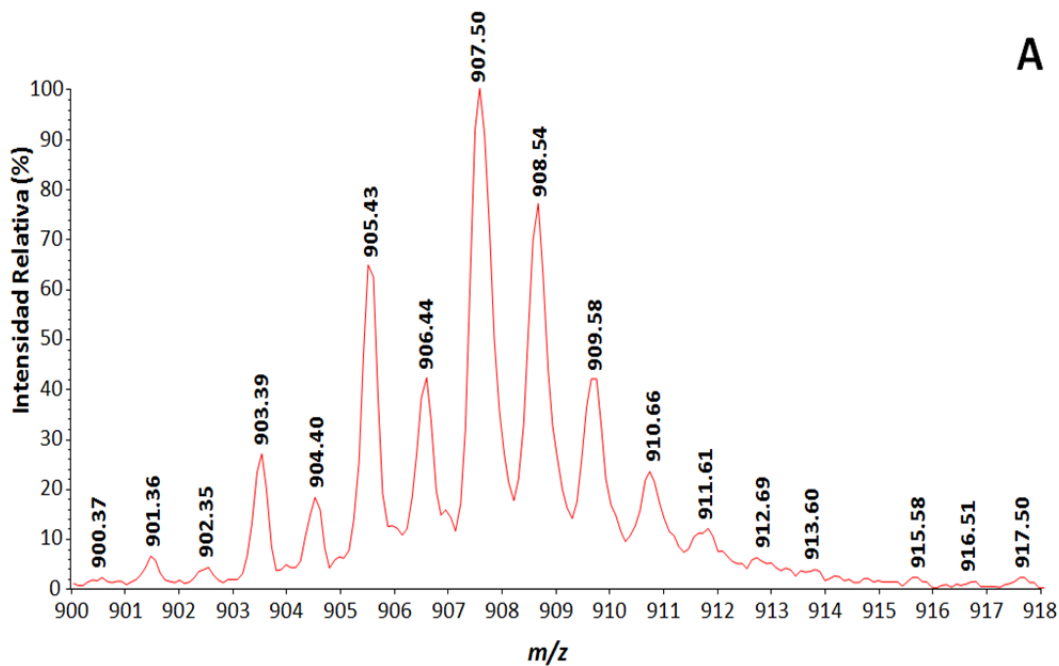


Figura IX.11.- (A) Espectro de masas experimental obtenido mediante MALDI-TOF MS para el intervalo de relaciones m/z comprendidas entre 900 y 918 Da; (B) Distribución isotópicas para una mezcla de triglicéridos formada por LLL, LLO, LOO, OOO, OOS y SSO. Resolución: 1750.

Como se puede observar en la Figura IX.11.B, la distribución isotópica obtenida para la mezcla de triglicéridos sodiados LLL, LLO, LOO, OOO, OOS y SSO es igual al espectro de masas obtenido experimentalmente para este intervalo de relaciones m/z en la muestra de aceite estudiada (Figura IX.11.A), aunque la diferenciación entre los diferentes compuestos isobáricos no es posible mediante MALDI (Asbury *et al.*, 1999; Picariello *et al.*, 2009).

IX.2.3.2 Fingerprints o huellas dactilares de las muestras de aceite de oliva de fritura

La fritura es un proceso de naturaleza muy complejo donde los aceites o grasas son calentados repetidamente a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo prolongados y en presencia de aire. Este proceso provoca la aparición de reacciones de hidrólisis, oxidación y polimerización de los aceites o grasas, las cuales pueden originar diferentes compuestos de degradación de los triglicéridos.

En la Figura IX.12 se muestra el espectro de masas obtenido para una muestra de aceite de oliva procedente de un proceso de fritura en el intervalo $500 \leq m/z \leq 1150$ Da, obtenido en las condiciones experimentales optimizadas de la matriz y con las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

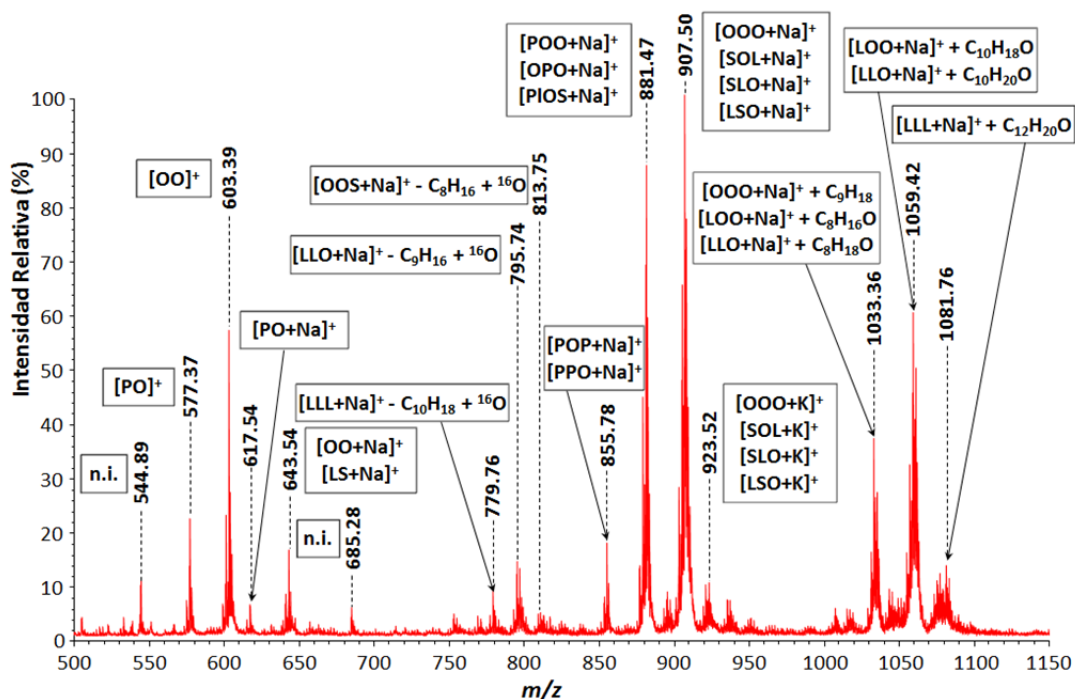


Figura IX.12.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para una muestra de aceite de oliva de fritura, diluida en cloroformo a una concentración de 0,4 % (v/v), empleando como matriz una disolución de DHB en acetona con un 0,25 % de TFA, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

Como se observa en la Figura IX.12, la muestra de aceite de oliva de fritura presenta dos grupos de señales en dos intervalos de relaciones m/z comprendido entre 750 y 850 Da y entre 1000 y 1100 Da, las cuales no se observaron en el espectro de masas del aceite de oliva sin usar estudiado previamente (Figura IX.7). Por lo tanto, la aparición de estos nuevos compuestos puede deberse al proceso de fritura al que se ha sometido el aceite. Durante dicho proceso, el aceite sufre reacciones de autooxidación debidas a las elevadas temperaturas a las que se expone de forma continuada en el tiempo (Schiller *et al.*, 2002a, 2002b; Picariello *et al.*, 2009).

Los hidroperóxidos son los compuestos derivados de la oxidación primaria de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite más característicos y abundantes, cuando éste

es sometido a elevadas temperaturas. Su estructura vendrá condicionada por la mezcla de ácidos grasos presentes en el aceite de fritura, especialmente los poliinsaturados. El proceso de oxidación transcurre a través de reacciones en cadena, mediadas por radicales libres, en un proceso en el que también interviene el oxígeno, dando lugar a los denominados productos de la β -oxidación de los dobles enlaces (Picariello *et al.*, 2009). Los dos mecanismos que se han postulado para la oxidación a elevadas temperaturas de las grasas insaturadas son los siguientes (Schiller *et al.*, 2002a, 2002b; Picariello *et al.*, 2009):

- Descomposición térmica por interacción entre radicales libres, cuando los ácidos grasos insaturados se someten de forma continua a temperaturas elevadas
- Descomposición inducida mediante la formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados, cuando éstos son expuestos a un calentamiento intermitente. Bajo estas condiciones, los hidroperóxidos se acumulan a bajas temperaturas, contribuyendo a la formación de radicales cuando los aceites se recalientan

Los hidroperóxidos pueden sufrir reacciones de oxidación, transformándose en alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos e hidrocarburos, o reacciones de deshidratación, transformándose en cetonas. Asimismo, los radicales peroxilo pueden dar lugar a la formación de dímeros, trímeros, epóxidos, éteres, etc.

En la Figura IX.13 se muestra un esquema de la reacción de oxidación de los triglicéridos, donde $RH\bullet$ representa la molécula de triglicérido sometida al proceso de oxidación en uno de sus grupos insaturados de la cadena de ácido graso. En la etapa de iniciación, se forma un radical alquilo por la pérdida de un hidrógeno desde una posición alílica o bis-alílica de la cadena de un ácido graso insaturado. En la etapa de propagación, los radicales alquilo formados reaccionan con el oxígeno para generar radicales peroxilo que, a su vez, reaccionan con nuevas moléculas de triglicéridos, originando hidroperóxidos como productos de oxidación primaria y nuevos radicales alquilo que propagan la reacción. En la etapa de terminación, los radicales reaccionan entre sí, dando lugar a especies no radicalarias relativamente estables (Dobarganes, 2009a).

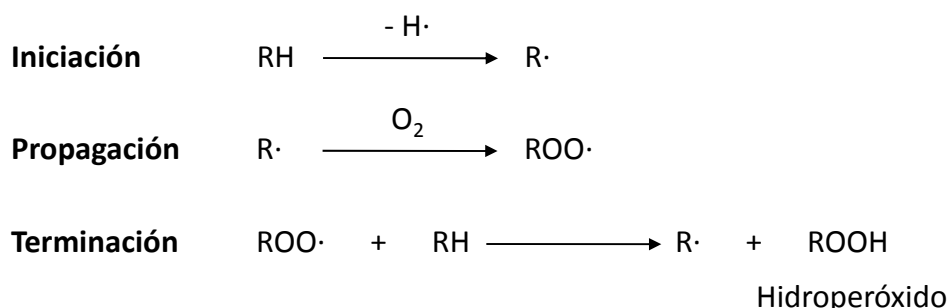


Figura IX.13.- Mecanismo de oxidación de triglicéridos y formación de hidroperóxidos.

El mecanismo de formación de compuestos de cadena corta a partir de los hidroperóxidos formados en las reacciones de autooxidación está basado en la β -oxidación homolítica de radicales alcoxi procedentes de hidroperóxidos alílicos. La β -escisión homolítica

tiene lugar a ambos lados del carbono alcoxi, a través de las rutas A o B mostradas en la Figura IX.14. A través de este mecanismo, se producen dos tipos de aldehídos (volátiles y esterificados) y un radical alquilo o alqueniilo. La interacción de estos radicales con otros radicales de bajo peso molecular presentes en el aceite, como $\text{H}\cdot$ y $\text{OH}\cdot$, contribuye a su estabilización, mediante la formación de hidrocarburos y alcoholes. En resumen, la β oxidación de hidroperóxidos alílicos favorece la formación de aldehídos, esterificados o no, mientras que los radicales formados requieren una estabilización posterior con $\text{H}\cdot$ y $\text{OH}\cdot$, que compiten con otros radicales de elevado peso molecular. En una segunda etapa, los compuestos insaturados de cadena corta formados pueden sufrir procesos de oxidación a través de las mismas rutas (Dobarganes, 2009b).

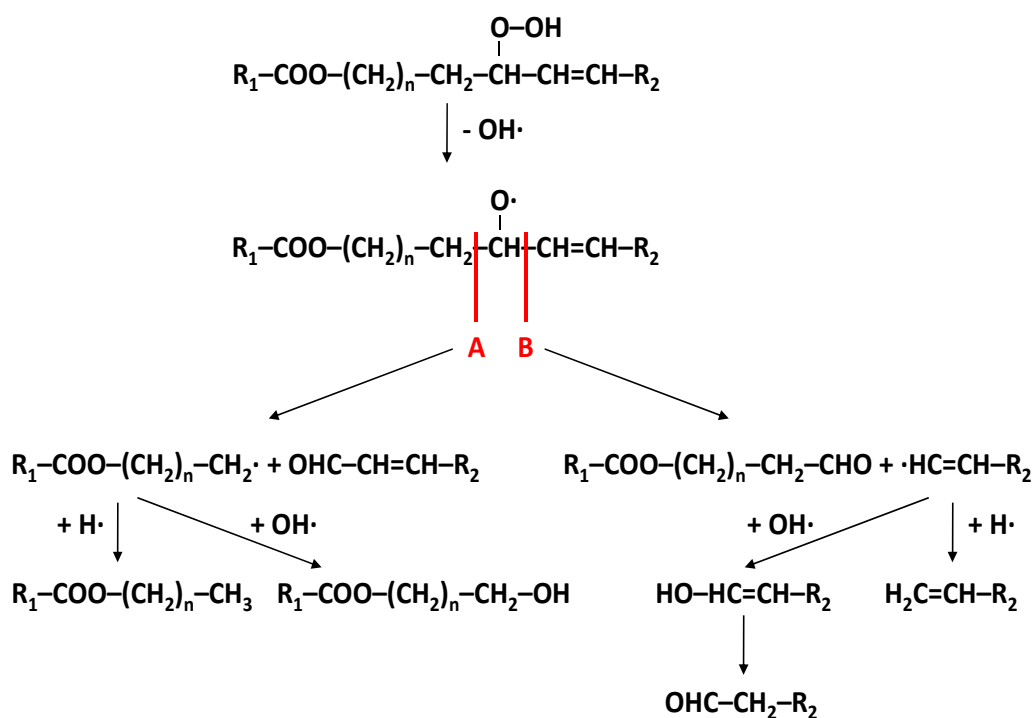


Figura IX.14.- Mecanismo de formación de compuestos de cadena corta a partir de hidroperóxidos alílicos.

Debido al limitado grado de insaturación de los aceites utilizados para procesos de fritura, los ácido oleico y linoleico son los ácidos grasos insaturados que son principalmente sometidos al proceso de degradación, por lo que los compuestos esperados volátiles y unidos a una cadena corta son aquellos procedentes de sus hidroperóxidos principales. En el caso del ácido oleico, la eliminación inicial de hidrógeno en la reacción de autooxidación ocurre en el carbono alílico 8 y 11, para originar dos radicales alílicos de tres carbonos deslocalizados. La siguiente reacción con oxígeno produce una mezcla de cuatro hidroperóxidos alílicos, que contienen grupos hidroperóxido en los carbonos 8, 9, 10 y 11. En el caso del ácido linoleico, que presenta dos dobles enlaces separados por un grupo metileno, la eliminación del hidrógeno está más favorecida porque existe un grupo metileno que está doblemente activado debido a dos doble enlaces adyacentes. La eliminación del hidrógeno tiene lugar en el carbono 11, dando lugar a un radical pentadienil estabilizado por resonancia, que reacciona

posteriormente con oxígeno en las posiciones de los carbonos 9 y 13, para producir una mezcla de dos dienos 9- y 13-hidroperóxidos principales conjugados. De esta forma, los compuestos esperados unidos a una cadena corta son aquellos procedentes de los seis hidroperóxidos principales de los ácidos oleico y linoleico, y sus proporciones relativas dependerán de la composición en ácidos grasos del aceite de fritura. De acuerdo con esto, en las Tablas IX.6 y IX.7 se muestran los compuestos principales esperados para compuestos volátiles y esterificados, respectivamente (Dobarganes, 2009b).

Tabla IX.6.- Compuestos volátiles formados por descomposición de los hidroperóxidos a través de la ruptura homolítica de los radicales alcóxido.

Grupos ácidos grasos	Hidroperóxido	Ruta A	Ruta B	
			+ OH [·]	+ H [·]
Oleato	8-ROOH	2-undecenal (C ₁₁ H ₂₀ O)	decanal (C ₁₀ H ₂₀ O)	1-deceno (C ₁₀ H ₂₀)
	9-ROOH	2-decenal (C ₁₀ H ₁₈ O)	nonanal (C ₉ H ₁₈ O)	1-noneno (C ₉ H ₁₈)
	10-ROOH	nonanal (C ₉ H ₁₈ O)	octanol (C ₈ H ₁₈ O)	octano (C ₈ H ₁₈)
	11-ROOH	octanal (C ₈ H ₁₆ O)	heptanol (C ₇ H ₁₆ O)	heptano (C ₇ H ₁₆)
Linoleato	9-ROOH	2,4-decadienal (C ₁₀ H ₁₆ O)	3-nonenal (C ₉ H ₁₆ O)	1,3-nonadieno (C ₉ H ₁₆)
	13-ROOH	hexanal (C ₆ H ₁₂ O)	pentanol (C ₅ H ₁₂ O)	pentano (C ₅ H ₁₂)

Tabla IX.7.- Compuestos de cadena corta esterificados formados por descomposición de los hidroperóxidos a través de la ruptura homolítica de los radicales alcóxido.

Grupos ácidos grasos	Hidroperóxido	Ruta A		Ruta B
		+ OH [·]	+ H [·]	
Oleato	8-ROOH	7-hidroxiheptanoato (C ₇ H ₁₃ O ₃)	heptanoato (C ₇ H ₁₃ O ₂)	8-oxooctanoato (C ₈ H ₁₃ O ₃)
	9-ROOH	8-hidroxi octanoato (C ₈ H ₁₅ O ₃)	octanoato (C ₈ H ₁₅ O ₂)	9-oxononanoato (C ₉ H ₁₅ O ₃)
	10-ROOH	9-oxononanoato (C ₉ H ₁₅ O ₃)	8-nonenoato (C ₉ H ₁₅ O ₂)	10-oxo-8-decenoato (C ₁₀ H ₁₆ O ₃)
	11-ROOH	10-oxodecanoato (C ₁₀ H ₁₇ O ₃)	9-decenoato (C ₁₀ H ₁₇ O)	11-oxo-9-undecenoato (C ₁₁ H ₁₇ O ₃)
Linoleato	9-ROOH	8-hidroxi octanoato (C ₈ H ₁₅ O ₃)	octanoato (C ₈ H ₁₅ O ₂)	9-oxononanoato (C ₉ H ₁₅ O ₃)
	13-ROOH	12-oxo-9-dodecenoato (C ₁₂ H ₁₉ O ₃)	9,11-dodecadienoato (C ₁₂ H ₂₀ O)	13-oxo-9,11-tridecadienoato (C ₁₃ H ₁₉ O ₃)

Por lo tanto, como se ha comentado anteriormente, en los aceites de fritura se observó la aparición de nuevas señales comprendidas en el intervalo $700 \leq m/z \leq 850$ Da, que no se observaron en la muestra de aceite de oliva sin usar. De acuerdo con el estudio de las distribuciones isotópicas, estas nuevas señales se corresponden con fragmentos derivados de la β -escisión homolítica de los triglicéridos en los que existen ácidos grasos insaturados, como los ácidos linoleico u oleico, perdiendo una parte de la cadena carbonada y apareciendo, en algunos casos, acompañados por una molécula de oxígeno, como consecuencia de la oxidación de los aceites. También se observan señales con relaciones m/z en el intervalo comprendido entre 1000 y 1100 Da, correspondientes a los triglicéridos acoplados con los mencionados fragmentos derivados de la β -escisión homolítica de los mismos. De esta forma, se distingue la formación de aldehídos y cetonas en los aceites como consecuencia de las elevadas temperaturas a las que son sometidos, cuyas señales aparecen acopladas con triglicéridos insaturados formando un agrupamiento de señales.

En la Figura IX.15 se muestra la zona del espectro de masas correspondiente a las relaciones m/z comprendidas entre 700 y 870 Da para la muestra de aceite de oliva de fritura.

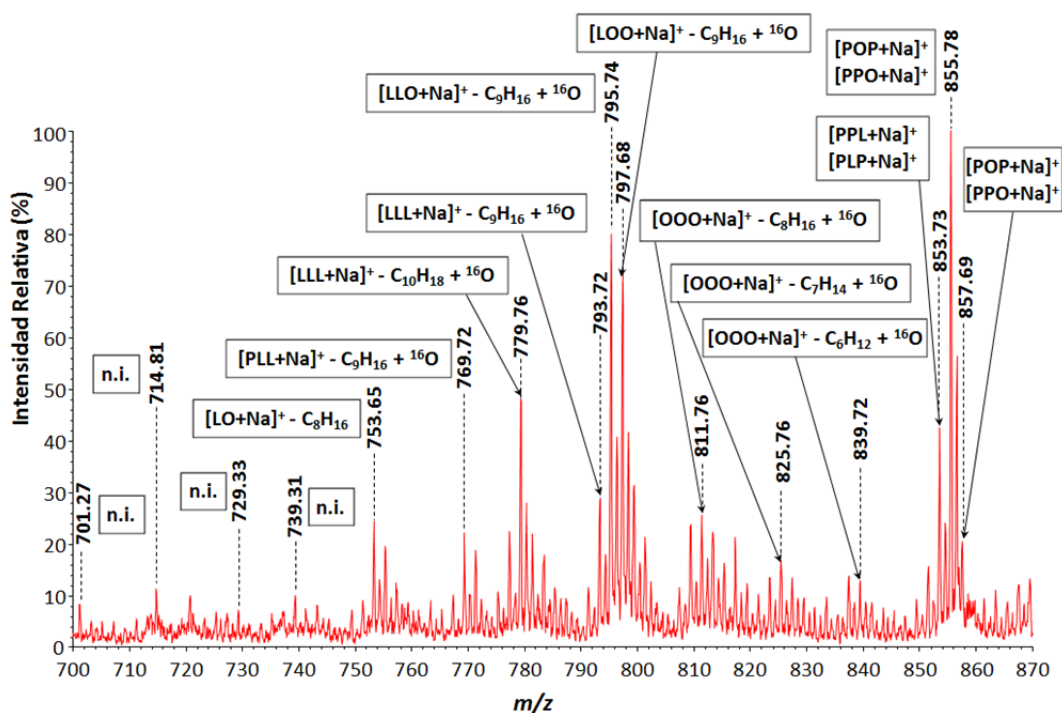


Figura IX.15.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva de fritura, en la zona de relaciones m/z comprendida entre 700 y 870 Da, correspondientes a los productos de la β -escisión homolítica de los di y triglicéridos, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

Como se observa en la Figura IX.15, el producto más abundante de la β -escisión homolítica está representado por el agrupamiento de señales centrado en la relación m/z de 795,74 Da, el cual está formado por el triglicérido LLO que contiene el 9-oxononanoato generado por la ruptura homolítica de uno de los dobles enlaces de los ácidos oleico y/o linoleico debido a la oxidación del triglicérido, perdiendo la cadena carbonada $-C_9H_{16}$. Por

analogía, y con una menor intensidad relativa en el espectro de masas, los agrupamientos de señales centrados en las relaciones m/z 811,76; 825,76 y 839,72 Da se pueden asignar al 10-oxo-8-decenoato, 11-oxo-9-undecenoato y 12-oxo-7-dodecenoato conteniendo el triglicérido OOO, respectivamente. Estas especies han surgido como consecuencia de la ruptura homolítica de uno de los dobles enlaces de los ácidos oleico y/o linoleico, originando la pérdida de una cadena carbonada de C_8H_{14} , C_7H_{14} y C_6H_{12} , respectivamente, durante el proceso de oxidación. Por lo tanto, y teniendo en cuenta la posible formación de hidroperóxidos en triglicéridos insaturados y la consecuente descomposición térmica de los mismos al someter al aceite a elevadas temperaturas, en la Tabla IX.8 se muestran las asignaciones realizadas para las relaciones m/z en el intervalo comprendido entre 700 y 870 Da observadas en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS de la muestra de aceite de oliva de fritura (Figura IX.12 y IX.15), a fragmentos derivados de la β -escisión homolítica de los triglicéridos presentes en el aceite de oliva de fritura, siendo C_xH_y la pérdida de la cadena carbonada del triglicérido debida a la ruptura homolítica.

Tabla IX.8.- Relaciones m/z observadas en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS de la muestra de aceite de oliva de fritura y asignaciones a fragmentos derivados de la β -escisión homolítica de los triglicéridos.

m/z		Fragmentos de la β -escisión homolítica	m/z		Fragmentos de la β -escisión homolítica
Observada	Teórica		Observada	Teórica	
701,27	-	n.i.	799,76	799,64	[OOO+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O
714,81	-	n.i.	801,79	801,66	[OOS+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O
721,42	-	n.i.	803,75	803,58	[LLLn+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
729,33	-	n.i.	805,77	805,59	[LLL+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
739,31	-	n.i.	807,76	807,61	[LLO+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
744,32	-	n.i.	809,74	809,62	[LOO+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
751,61	751,62	[LL+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆	811,76	811,64	[OOO+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
753,65	753,62	[LO+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆	813,75	813,66	[OOS+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
755,63	755,65	[OO+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆	815,76	815,66	[SSO+Na] ⁺ - C ₈ H ₁₆ + ¹⁶ O
763,61	763,62	[LL+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆	817,71	817,58	[LLLn+Na] ⁺ - C ₇ H ₁₄ + ¹⁶ O
765,60	765,62	[LO+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆	819,72	819,61	[LLL+Na] ⁺ - C ₇ H ₁₄ + ¹⁶ O
769,72	769,59	[PLL+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	821,79	821,62	[LLO+Na] ⁺ - C ₇ H ₁₄ + ¹⁶ O
771,71	771,61	[PLO+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	823,72	823,64	[LOO+Na] ⁺ - C ₇ H ₁₄ + ¹⁶ O
773,73	773,62	[POO+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	825,76	825,66	[OOO+Na] ⁺ - C ₇ H ₁₄ + ¹⁶ O
777,75	777,56	[LLLn+Na] ⁺ - C ₁₀ H ₁₈ + ¹⁶ O	827,79	827,67	[OOS+Na] ⁺ - C ₇ H ₁₄ + ¹⁶ O
779,76	779,58	[LLL+Na] ⁺ - C ₁₀ H ₁₈ + ¹⁶ O	831,73	831,62	[LLLn+Na] ⁺ - C ₆ H ₁₂ + ¹⁶ O
781,75	781,59	[LLO+Na] ⁺ - C ₁₀ H ₁₈ + ¹⁶ O	833,72	833,62	[LLL+Na] ⁺ - C ₆ H ₁₂ + ¹⁶ O
783,76	783,61	[LOO+Na] ⁺ - C ₁₀ H ₁₈ + ¹⁶ O	835,71	835,64	[LLO+Na] ⁺ - C ₆ H ₁₂ + ¹⁶ O
785,73	785,62	[OOO+Na] ⁺ - C ₁₀ H ₁₈ + ¹⁶ O	837,76	837,66	[LOO+Na] ⁺ - C ₆ H ₁₂ + ¹⁶ O
787,75	787,64	[OOS+Na] ⁺ - C ₁₀ H ₁₈ + ¹⁶ O	839,72	839,67	[OOO+Na] ⁺ - C ₆ H ₁₂ + ¹⁶ O
791,73	791,58	[LLLn+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	841,78	841,69	[OOS+Na] ⁺ - C ₆ H ₁₂ + ¹⁶ O
793,72	793,59	[LLL+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	845,72	845,62	[LLLn+Na] ⁺ - C ₅ H ₁₀ + ¹⁶ O
795,74	795,61	[LLO+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	847,73	847,64	[LLL+Na] ⁺ - C ₅ H ₁₀ + ¹⁶ O
797,68	797,62	[LOO+Na] ⁺ - C ₉ H ₁₆ + ¹⁶ O	849,76	849,66	[LLO+Na] ⁺ - C ₅ H ₁₀ + ¹⁶ O

n.i. = no identificado

Como se observa en la Tabla IX.8, las señales asignadas están formadas por cuatro diglicéridos y un conjunto de triglicéridos, que presentan fragmentos originados por la β -escisión homolítica, en cuya composición están presentes los ácidos oleico y/o linoleico.

La confirmación de las asignaciones realizadas se realizó mediante la elaboración de un modelo teórico de los posibles aductos presentes en el espectro de masas para cada conjunto de relaciones m/z . La Figura IX.16 muestra el espectro de masas experimental (Figura IX.16.A) obtenido para las relaciones m/z en el intervalo comprendido entre 792 y 802 Da y la distribución isotópica (Figura IX.16.B) de la mezcla de triglicéridos LLL, LLO y LOO tras la

pérdida de una cadena carbonada $-C_9H_{16}$ como consecuencia de la oxidación de los triglicéridos.

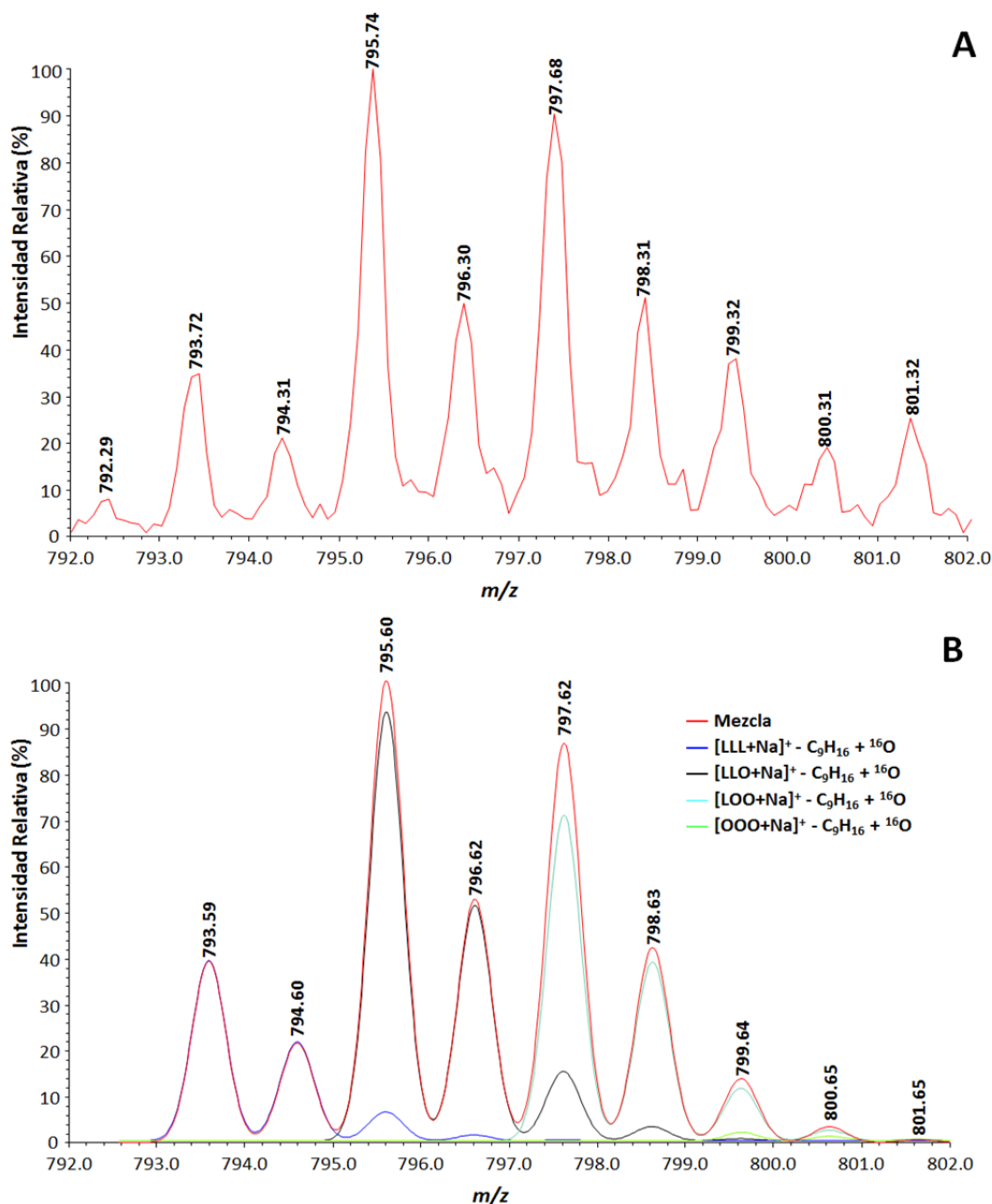


Figura IX.16.- (A) Espectro de masas experimental obtenido mediante MALDI-TOF MS para las relaciones m/z comprendidas entre 792 y 802 Da; (B) Distribución isotópica para una mezcla de triglicéridos formada por LLL, LLO, LOO y OOO tras la pérdida de $-C_9H_{16}$ como consecuencia de la oxidación de los mismos. Resolución: 1750.

Como puede observarse en la Figura IX.16.B, la distribución isotópica correspondiente a la mezcla de triglicéridos LLL, LLO, LOO y OOO, conteniendo el 9-oxononanoato generado por la ruptura homolítica de uno de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados (oleico y/o linoleico) debido a la oxidación del triglicérido, perdiendo la cadena carbonada $-C_9H_{16}$, coincide con el espectro de masas obtenido experimentalmente para este mismo intervalo de relaciones m/z en la muestra de aceite estudiada (Figura IX.16.A), lo que permite confirmar la asignación realizada, sin considerar los compuestos isobáricos. Los resultados obtenidos

mediante las correspondientes distribuciones isotópicas están de acuerdo con la bibliografía (Picariello *et al.*, 2009).

Respecto a los agrupamientos de señales con relaciones m/z superiores a 1000 Da, éstos se corresponden con la asociación de triglicéridos insaturados con los fragmentos procedentes de la β -escisión homolítica de los mismos. Estos agrupamientos se deben, principalmente, a la adición de los aldehídos producidos por la fragmentación de los triglicéridos a la cadena ramificada de los mismos, aunque también es posible la adición de cadenas alifáticas a los triglicéridos (Picariello *et al.*, 2009). En la Figura IX.17 se muestra la zona del espectro de masas correspondiente a las relaciones m/z comprendidas entre 1000 y 1100 Da para la muestra de aceite de oliva de fritura.

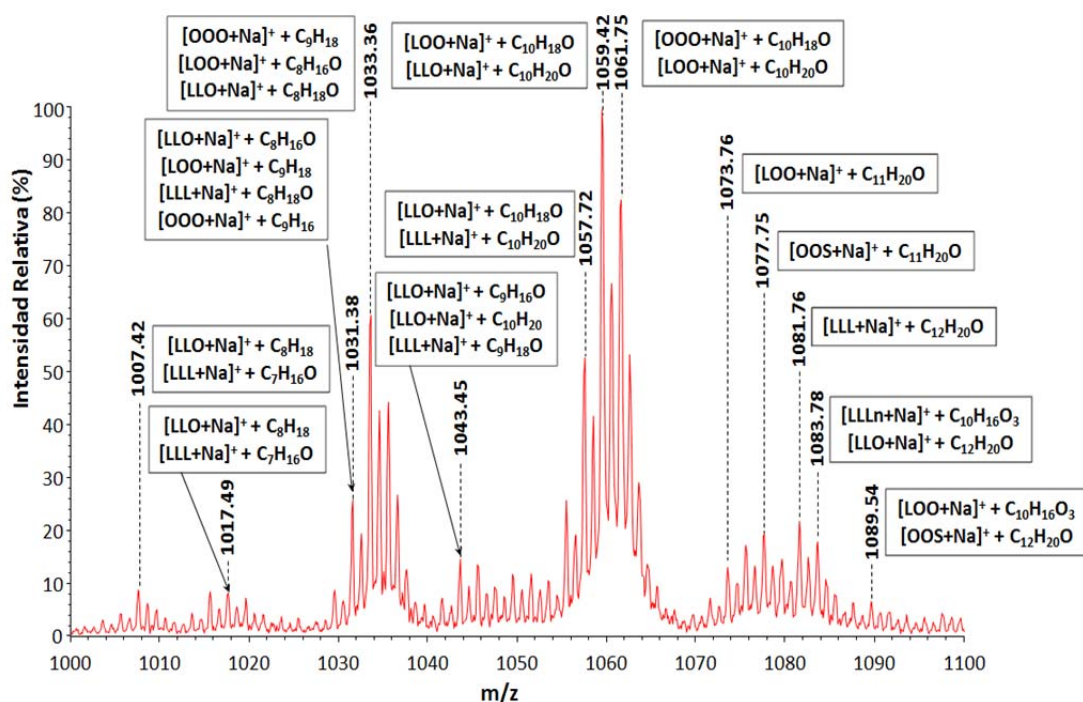


Figura IX.17.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de aceite de oliva de fritura, en el intervalo de $1000 \leq m/z \leq 1100$ Da, correspondiente a los productos formados por el acoplamiento de los triglicéridos con los fragmentos de la β -escisión homolítica de los mismos, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias.

Como se observa en la Figura IX.17, el agrupamiento de señales centradas en 1033,36 Da se puede atribuir la asociación de distintos iones procedentes de la β -escisión homolítica del ácido oleico y el solapamiento de sus señales. El acoplamiento del octanal y del 1-noneno dentro del grupo de los triglicéridos LLL, LLO, LOO, OOO, OOS y SSO, centrados en LOO y en OOO, respectivamente, presentan esta misma relación m/z . De igual forma, el agrupamiento de señales centradas en el valor de 1059,42 Da se puede asignar al acoplamiento de los triglicéridos con dos fragmentos procedentes de la β -escisión homolítica del ácido oleico (Tabla IX.9) y al solapamiento de sus señales. Se puede asignar al acoplamiento centrado entre el triglicérido LOO y una molécula de 2-decenal, pero también se puede asignar al

acoplamiento entre una molécula de decanal y el triglicérido LLO dentro del mismo agrupamiento de triglicéridos insaturados indicado anteriormente.

Las señales correspondientes al intervalo de m/z comprendido entre 1071,76 y 1097,48 Da presentan bajas intensidades relativas en el espectro de masas y su identificación es similar a lo mencionado anteriormente, donde las moléculas que se adicionan a los triglicéridos pueden estar formadas por cadenas más largas derivadas de fragmentos de la β -escisión homolítica, como por ejemplo 9,11-dodecadienoato ($C_{12}H_{20}O$), 10-oxo-8-decenoato ($C_8H_{16}O_3$) o la especie $C_{13}H_{22}O$ que no pudo ser identificada. En la Tabla IX.9 se muestran las asignaciones realizadas para las relaciones m/z en el intervalo comprendido entre 1000 y 1100 Da, observadas en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS de la muestra de aceite de oliva de fritura (Figura IX.12 y IX.17), a triglicéridos acoplados a fragmentos derivados de la β -escisión homolítica de la muestra de aceite de oliva de fritura producida por la oxidación de la misma.

Tabla IX.9.- Relaciones m/z observadas en el espectro MALDI-TOF MS de la muestra de aceite de oliva de fritura y posibles asignaciones a triglicéridos acoplados a fragmentos derivados de la β -escisión homolítica.

m/z		TAG acoplados a fragmentos de la β -escisión	m/z		TAG acoplados a fragmentos de la β -escisión
Observada	Teórica		Observada	Teórica	
1001,46	1001,81	[LLL+Na] ⁺ + C ₆ H ₁₂ O	1027,45	1027,86	[LLL+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈
	1001,85	[LLL+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆		1027,92	[LLO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆
1003,45	1003,82	[LLO+Na] ⁺ + C ₆ H ₁₂ O	1029,42	1029,88	[LLO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈
	1003,87	[LLO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆		1029,87	[LOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆
1005,47	1005,84	[LOO+Na] ⁺ + C ₆ H ₁₂ O	1029,84	1029,84	[LLL+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₆ O
	1005,88	[LOO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆			[LLLn+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈ O
1007,42	1007,86	[OOO+Na] ⁺ + C ₆ H ₁₂ O	1031,38	1031,85	[LLO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₆ O
	1007,89	[OOO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆		1031,89	[LOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈
1009,46	1009,88	[OOS+Na] ⁺ + C ₆ H ₁₂ O	1033,36	1031,89	[LLL+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈ O
	1009,91	[OOS+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆		1033,91	[OOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆
1011,43	1011,89	[SSO+Na] ⁺ + C ₆ H ₁₂ O	1033,36	1033,91	[OOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈
	1011,93	[SSO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆		1033,87	[LOO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₆ O
1013,45	1013,85	[LLLn+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈	1035,81	1035,93	[LLO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈ O
	1015,46	[LLL+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈		1035,89	[OOS+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈
1015,46	1015,86	[LLLn+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O	1037,76	1037,94	[OOO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₆ O
	1015,83	[LLLn+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O		1037,90	[LOO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈ O
1017,49	1017,88	[LLO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈	1039,82	1039,91	[SSO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈
	1017,84	[LLL+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O		1039,83	[OOS+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₆ O
1019,47	1019,89	[LOO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈	1041,47	1039,92	[OOO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈ O
	1019,85	[LLO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O		1039,86	[LLLn+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀
1021,45	1021,91	[OOO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈	1041,84	1041,84	[LLL+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆ O
	1021,87	[LOO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O		1041,87	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀
1023,41	1023,83	[OOS+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈	1041,84	1041,84	[SSO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈ O
	1023,89	[OOO+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O			[LLLn+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O
1025,48	1025,94	[SSO+Na] ⁺ + C ₈ H ₁₈			
	1025,84	[LLLn+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈			
	1025,85	[LLL+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆			
	1025,90	[OOS+Na] ⁺ + C ₇ H ₁₆ O			

Cont. Tabla IX.9.- Relaciones m/z observadas en el espectro MALDI-TOF MS de la muestra de aceite de oliva de fritura y posibles asignaciones a triglicéridos acoplados a fragmentos derivados de la β -escisión homolítica.

m/z		TAG acoplados a fragmentos de la β -escisión	m/z		TAG acoplados a fragmentos de la β -escisión
Observada	Teórica		Observada	Teórica	
1043,45	1043,86	[LLO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆ O	1065,78	1065,94	[SSO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O
	1043,89	[LLO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀			[OOS+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O
	1043,85	[LLL+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O	1067,74	1067,95	[SSO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O
1045,71	1045,87	[LOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆ O		1067,85	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₁ H ₂₀ O
	1045,90	[LOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀		1069,48	1069,87
	1045,87	[LLO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O	1071,74	1071,89	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₁ H ₂₀ O
1047,42	1047,89	[OOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆ O	1073,76	1073,90	[LOO+Na] ⁺ + C ₁₁ H ₂₀ O
	1047,92	[OOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀	1075,72	1075,92	[OOO+Na] ⁺ + C ₁₁ H ₂₀ O
	1047,89	[LOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O	1077,75	1077,93	[OOS+Na] ⁺ + C ₁₁ H ₂₀ O
1049,47	1049,90	[OOS+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆ O	1079,71	1079,95	[SSO+Na] ⁺ + C ₁₁ H ₂₀ O
	1049,94	[OOS+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀		1079,85	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
	1049,91	[OOO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O	1081,76	1081,87	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
1051,41	1051,91	[SSO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₆ O	1083,78	1083,81	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
	1051,95	[SSO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀		1083,89	[LLO+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
	1051,92	[OOS+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O	1085,74	1085,83	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
1053,71	1053,94	[SSO+Na] ⁺ + C ₉ H ₁₈ O		1085,90	[LOO+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
	1053,84	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O	1087,72	1087,84	[LLO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
1055,59	1055,86	[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O		1087,92	[OOO+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
		[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O	1089,54	1089,86	[LOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
1057,72	1057,87	[LLO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O		1089,83	[OOS+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
		[LLL+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O	1091,49	1091,87	[OOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
1059,42	1059,89	[LOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O		1091,95	[SSO+Na] ⁺ + C ₁₂ H ₂₀ O
		[LLO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O	1093,79	1093,89	[OOS+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
1061,75	1061,90	[OOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O	1095,65	1095,89	[SSO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₆ O ₃
		[LOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O	1097,48	1097,86	[LOO+Na] ⁺ + C ₁₃ H ₂₂ O
1063,51	1063,92	[OOS+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₁₈ O			
		[OOO+Na] ⁺ + C ₁₀ H ₂₀ O			

La elaboración de las distribuciones isotópicas permite confirmar las asignaciones realizadas para cada uno de los agrupamientos de señales. A modo de ejemplo, en la Figura IX.18 se muestra el espectro de masas experimental (Figura IX.18.A) obtenido para las relaciones m/z comprendidas entre 1054 y 1072 Da y la distribución isotópica (Figura IX.18.B) obtenida para un conjunto de triglicéridos formados por el acoplamiento entre LLL, LLO, LOO, OOO, OOS y SSO y la molécula de 2-decenal generada por la β -escisión homolítica de los triglicéridos producida por la oxidación de los mismos.

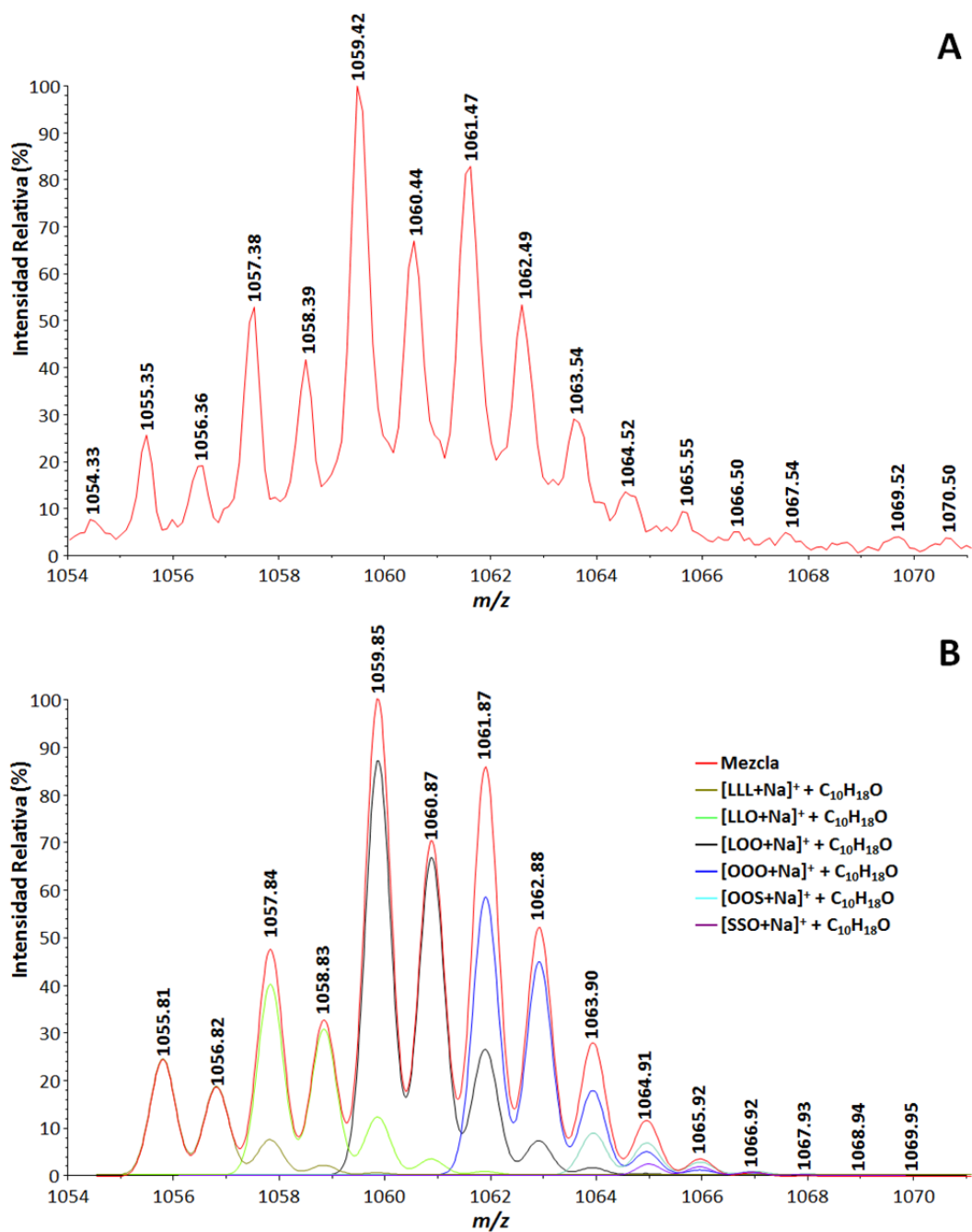


Figura IX.18.- (A) Espectro de masas experimental obtenido mediante MALDI-TOF MS para las relaciones m/z comprendidas entre 1054 y 1072 Da; (B) Distribución isotópica para una mezcla de triglicéridos formada por el acoplamiento entre LLL, LLO, LOO, OOO, OOS y SSO y el 2-decanal generado como consecuencia de la β -escisión homolítica. Resolución: 1750.

Del mismo modo que en los casos anteriores, el modelo de distribución isotópica obtenido presenta una distribución coincidente con el resultado conseguido de forma experimental. Sin embargo, en este caso la distribución teórica correspondiente a la otra asignación realizada (acoplamiento de una molécula de decanal y el mismo grupo de triglicéridos, centrados en el LLO) también es igual al espectro de masas experimental, por lo que no es posible diferenciar entre los compuestos isobáricos. Los resultados obtenidos a partir de las correspondientes distribuciones isotópicas están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Picariello *et al.*, 2009).

IX.2.3.3 Caracterización del resto de muestras de aceite analizadas

Una vez analizadas las muestras de aceite de oliva sin usar y de fritura, se estudió la composición del resto de muestras de aceite objeto de estudio de la presente Memoria mediante MALDI-TOF MS en las condiciones experimentales optimizadas. La asignación de las señales m/z observadas en los espectros de masas se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el aceite de oliva mediante MALDI-TOF MS, puesto que la composición de este tipo de aceite es mucho más compleja (Schiller *et al.*, 2004; Chapagain *et al.*, 2009a; Fuchs *et al.*, 2010), así como los resultados obtenidos mediante GC-FID, a partir de los cuales se observó que los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva también lo están en la mayoría de los aceites estudiados. De acuerdo con los resultados obtenidos por GC-FID, en las muestras de aceite de semillas, colza y soja-girasol también se encontraron pequeñas concentraciones de ácido araquídico, por lo que es necesario tener en cuenta la aparición de triglicéridos que contengan este ácido graso en su composición. De acuerdo con la bibliografía consultada, los triglicéridos más habitualmente encontrados en aceites que contienen ácido araquídico están formados por $[ALL+Na]^+$ (933,76 Da), $[AOL+Na]^+$ (935,46 Da), $[ASL+Na]^+$ ó $[OOA+Na]^+$ (937,56 Da) y $[ASO+Na]^+$ (939,39 Da) (Saraiva *et al.*, 2009). Debido a que en el ácido araquídico no existen dobles enlaces en su estructura, no aparecerán las señales correspondientes a productos generados por la β -escisión homolítica ni acoplamiento de triglicéridos con dichos fragmentos.

La Tabla IX.10 muestra un resumen de las relaciones m/z observadas en los espectros MALDI-TOF MS de las distintas muestras de aceite analizadas, así como las asignaciones realizadas a fragmentos iónicos, di y triglicéridos, fragmentos de la β -escisión homolítica y triglicéridos acoplados a los fragmentos de la β -escisión homolítica.

Tabla IX.10.- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF
Fragmentos iónicos	575,47	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	577,37	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	579,47	✓	✓											✓	✓
	597,52	✓	✓											✓	✓
	599,51	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	601,50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	603,39	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	605,46	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Diglicéridos	615,55	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	617,54	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	637,50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	639,50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	641,55	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	643,54	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	645,41	✓	✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
	647,51	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	657,51	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	659,54	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓

Cont. Tabla IX.10. (1)- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF
Fragmentos de la β-escisión homolítica	751,61		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	753,65		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	755,63		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	763,61		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	765,60		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	769,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	771,71		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	773,73		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	777,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	779,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	781,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	783,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	785,73		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	787,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	791,73		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	793,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	795,74		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	797,68		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	799,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	801,79		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
803,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	

Cont. Tabla IX.10. (2)- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF
Fragmentos de la β-escisión homolítica	805,77		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	807,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	809,74		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	811,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	813,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	815,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	817,71		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	819,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	821,79		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	823,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	825,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	827,79		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	831,73		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	833,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	835,71		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	837,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	839,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	841,78		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	845,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
847,73		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	
849,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	

Cont. **Tabla IX.10. (3)**- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF
Triglicéridos	851,69	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	853,73	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	855,78	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	857,69	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	871,18	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓
	875,72	✓	✓												
	877,41	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	879,43	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	881,47	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	883,78	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓
	885,79	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	893,78	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	895,74	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	897,75	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	899,74	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
901,78	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Cont. Tabla IX.10. (4)- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF
Triglicéridos	903,79	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	905,78	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	907,50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	909,78	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	911,81	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	913,82	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	915,58	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	917,75	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	919,76	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	921,74	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	923,52	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	925,75	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	933,76			✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓
	935,46			✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓
	937,56			✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓
939,39			✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	

Cont. Tabla IX.10. (5)- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF	
Triglicéridos acoplados a fragmentos de la β-escisión homolítica	1001,46		✓				✓				✓		✓	✓	✓	
	1003,45		✓		✓		✓		✓				✓	✓	✓	
	1005,47		✓										✓	✓	✓	
	1007,42		✓		✓		✓		✓		✓			✓	✓	
	1009,46		✓											✓	✓	
	1011,43		✓				✓		✓		✓		✓	✓	✓	
	1013,45		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	
	1015,46		✓				✓				✓		✓	✓	✓	
	1017,49		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	
	1019,47		✓		✓				✓		✓		✓	✓	✓	
	1021,45		✓											✓	✓	
	1023,41		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	
	1025,48		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	
	1027,45		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	
	1029,42		✓												✓	✓
	1031,38		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓
	1033,36		✓		✓		✓		✓				✓	✓	✓	✓
	1035,81		✓		✓				✓						✓	✓
	1037,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓
	1039,82		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓
1041,47		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓	
1043,45		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓	
1045,71		✓		✓		✓		✓						✓	✓	
1047,42		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓	
1049,47		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓	

Cont. Tabla IX.10. (6)- Resumen de las especies identificadas mediante MALDI-TOF MS en las muestras de aceite estudiadas.

	<i>m/z</i>	AOL	AOF	AGL	AGF	ASL	ASF	ACL	ACF	AML	AMF	ASGL	ASGF	AOGF	AOGMF
Triglicéridos acoplados a fragmentos de la β-escisión homolítica	1051,41		✓		✓				✓		✓		✓	✓	✓
	1053,71		✓		✓		✓						✓	✓	✓
	1055,59		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1057,72		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1059,42		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1061,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1063,51		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1065,78		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1067,74		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1069,48		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1071,74		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1073,76		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1075,72		✓		✓									✓	✓
	1077,75		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1079,71		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓
	1081,76		✓		✓		✓				✓		✓	✓	✓
	1083,78		✓				✓				✓		✓	✓	✓
	1085,74		✓		✓		✓		✓				✓	✓	✓
	1087,72		✓		✓		✓		✓				✓	✓	✓
	1089,54		✓		✓		✓		✓				✓	✓	✓
1091,49		✓		✓		✓		✓					✓	✓	
1093,49		✓		✓				✓				✓	✓	✓	
1095,65		✓		✓		✓		✓					✓		
1097,48		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓	✓	

En general, se observa que los patrones principales de los espectros de masas obtenidos para los aceites sin usar, por un lado, y de fritura, por el otro, están perfectamente diferenciados pero guardan una gran similitud dentro de cada grupo. Las señales obtenidas mediante MALDI-TOF MS para las muestras de aceite procedentes de procesos de fritura son, por lo general, más intensas que las correspondientes a los aceites sin usar. Los espectros de masas han permitido identificar los diferentes fragmentos iónicos y las especies de di- y triglicéridos para todas las muestras de aceite estudiadas, así como fragmentos resultantes de la β -escisión homolítica de los triglicéridos y triglicéridos acoplados a estos fragmentos, resultantes del proceso de oxidación de los aceites de fritura al ser sometidos a elevadas temperaturas.

En los espectros MALDI-TOF MS de las muestras en la que está presente el aceite de oliva, ya sea sin usar o de fritura, destaca una señal con mayor intensidad relativa a una relación m/z de 907,50 Da, mientras que en los espectros del resto de aceites destaca una señal con una relación m/z de 901,78 Da de mayor intensidad. Según los estudios anteriores, la señal con una m/z de 907,50 Da se puede asignar al aducto sodiado de la trioleína [OOO+Na]⁺, que es el triglicérido más abundante en el aceite de oliva (Calvano *et al.*, 2005; Picariello *et al.*, 2009), mientras que la señal a una m/z de 901,78 Da se puede atribuir a la presencia del aducto sodiado de la trilinoleína [LLL+Na]⁺ (Ayorinde *et al.*, 1999a, 1999b).

Se observa que los triglicéridos ALL, AOL, ASL, OOA y ASO no aparecen en las muestras de aceite de oliva ni de maíz, debido a que el ácido araquídico no se encuentra presente en este tipo de aceites, lo que confirma los resultados que se obtuvieron por GC-FID. Otro aspecto importante a destacar es que las muestras de aceite de oliva son las únicas que presentan en su composición el ácido linolénico, por lo que los triglicéridos que presentan en su estructura este ácido graso sólo se identifican en este tipo de muestras.

Finalmente, a la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que las muestras de aceite que han sido sometidas a temperaturas elevadas han sufrido procesos de oxidación térmica ya que, como se puede observar en la Tabla IX.10, estas muestras son las únicas que presentan señales correspondientes a fragmentos de la β -escisión homolítica y triglicéridos acoplados con estos fragmentos. Este hecho constituye una clara diferencia entre los *fingerprints* o huellas dactilares de los aceites sin usar de los de fritura, por lo que es un indicativo para una posible diferenciación entre ambos tipos de aceites.

IX.3 Caracterización de las muestras de biodiesel mediante MALDI-TOF MS

IX.3.1 Optimización de la matriz

Como se ha comentado anteriormente, la caracterización de compuestos de baja masa molecular (inferior a 400-500 Da) mediante la técnica MALDI-TOF MS presenta muchas dificultades, debido a la interferencia espectral procedente de la matriz. Por este motivo, las señales m/z debidas a los FAMES, que son las principales especies presentes en el biodiesel y cuyos pesos moleculares oscilan entre aproximadamente 186 y 352 g mol^{-1} (no sodiados), no se pueden identificar en este tipo de muestras. De modo alternativo, esta técnica se utilizó para comprobar el éxito de la reacción de transesterificación, ya que en los espectros de masas de las muestras de biodiesel no deberían aparecer señales m/z correspondientes a los triglicéridos procedentes de los aceites empleados como materia prima, así como determinar si las muestras de biodiesel comercializadas han sido adulteradas con aceites vegetales.

Inicialmente, se ensayaron las mismas condiciones experimentales optimizadas para las muestras de aceite, es decir, se empleó una matriz formada por 10,0 mg de DHB disueltos en 1,0 mL de acetona, con 0,25 % de TFA, y dilución de la muestra de biodiesel en cloroformo a una concentración de 0,4 % (v/v). En el caso de las muestras de biodiesel, la energía mínima de ionización que dio lugar a una señal en el espectro (*threshold*) con buenas resoluciones fue de 80 u.a. En la Figura IX.19 se muestra el espectro de masas obtenido para una muestra de biodiesel producida a partir de aceite de oliva sin usar en las condiciones experimentales que se acaban de describir, siguiendo las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

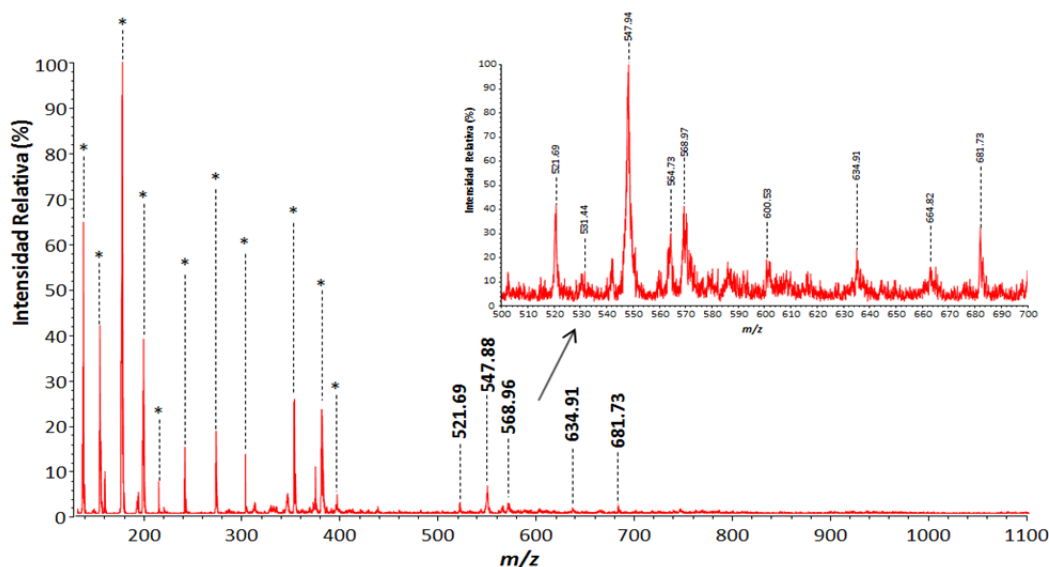


Figura IX.19.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para una muestra de biodiesel, producida a partir de aceite de oliva sin usar, diluida en cloroformo a una concentración del 0,4 % (v/v), empleando como matriz una disolución de DHB en acetona con un 0,25 % de TFA. (* Señales correspondientes a la matriz).

En la Figura IX.19 se observa que la matriz utilizada no permitía obtener ninguna señal diferente a las propias de la matriz (Figura IX.6.A), con la excepción de un agrupamiento de señales centradas en una relación m/z de 547,88 Da, que no se identificaron en las muestras de aceite y otras señales de muy baja intensidad (634,91 y 681,73 Da). Por lo tanto, se puede afirmar que debido a la complejidad de las muestras, la matriz DHB con un 0,25 % de TFA, utilizada para el análisis de los aceites, no permitió la ionización de las especies presentes en las muestras de biodiesel.

Para mejorar la ionización del biodiesel por MALDI, se realizaron unos ensayos modificando las condiciones de la matriz. Se optimizó la concentración de TFA en la matriz, formada por 10,0 mg de DHB disueltos en 1,0 mL de acetona, a la que se adicionaron tres concentraciones distintas de TFA: 0,50 %; 0,75 % y 1,25 %. Estos estudios se realizaron con una muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva sin usar. Teniendo en cuenta que el biodiesel presenta una composición diferente a la del aceite de procedencia y para asegurar la correcta dilución del mismo, se incrementó el factor de dilución, de forma que las muestras se diluyeron en cloroformo a una concentración del 1,0 % (v/v), obteniendo mejores resultados que al utilizar el factor de dilución empleado con los aceites. En la Figura IX.20 se muestran los espectros de masas obtenidos para la muestra de biodiesel diluida en las condiciones descritas, añadiendo a la matriz un 0,50 % de TFA (Figura IX.20.A); 0,75 % de TFA (Figura IX.20.B) y 1,25 % de TFA (Figura IX.20.C), en las condiciones instrumentales óptimas mostradas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

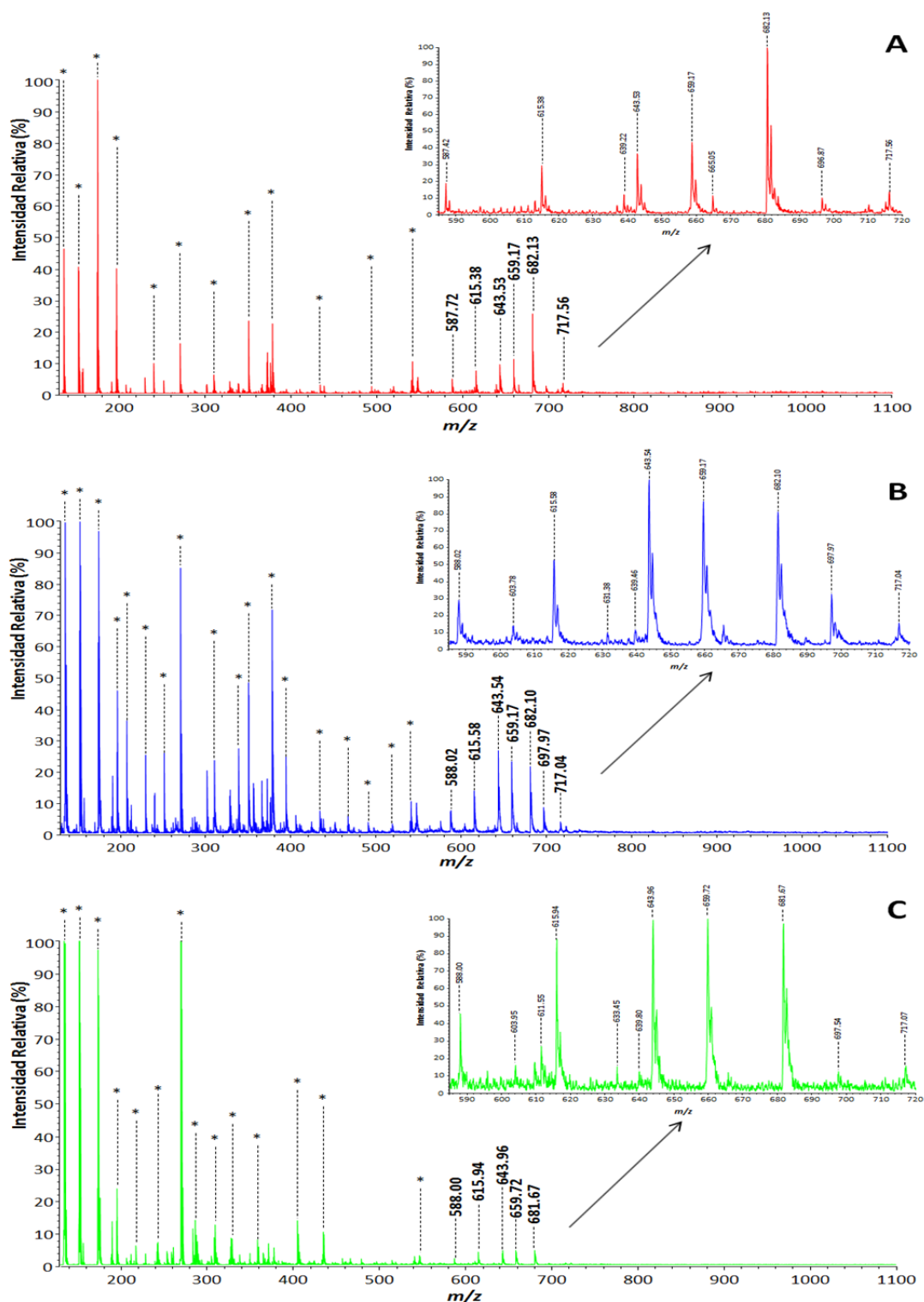


Figura IX.20.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para una muestra de biodiesel, producida a partir de aceite de oliva sin usar, diluida a una concentración del 1,0 % (v/v), utilizando como matriz una disolución saturada de DHB en acetona con (A) 0,50 % de TFA; (B) 0,75 % de TFA y (C) 1,25 % de TFA. (* Señales correspondientes a la matriz).

Como se observa en la Figura IX.20, la adición de una concentración de TFA de 0,50 % o 1,25 % a la matriz de DHB (Figura IX.20.A y Figura IX.20.C) permite mejorar la ionización de la muestra de biodiesel, aunque en algunos casos, las señales se podrían confundir con la señal de fondo del espectro. Sin embargo, el empleo de una concentración de TFA de 0,75 % (Figura

IX.20.B) permite la obtención de señales m/z de mayor intensidad, debido a una mejor ionización de las especies presentes en el biodiésel. Por lo tanto, los mejores resultados en términos de ionización y resolución de las señales obtenidas se consiguieron al utilizar como matriz una disolución de DHB en acetona con un 0,75 % de TFA.

En la Figura IX.21 se muestra el espectro de masas obtenido para la matriz optimizada, en ausencia de muestra de biodiésel, con objeto de poder distinguir entre las señales propias de la matriz y las correspondientes a la muestra.

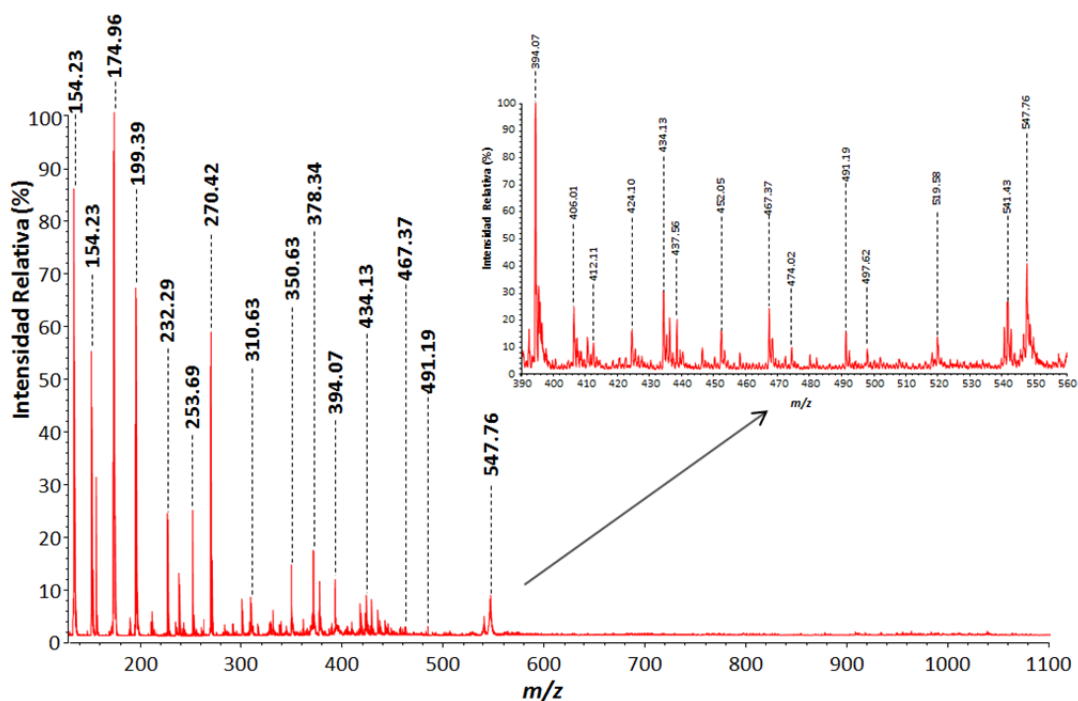


Figura IX.21.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la matriz optimizada para el análisis de las muestras de biodiésel (disolución de DHB en acetona con un 0,75 % TFA), en ausencia de muestra.

De acuerdo con la Figura IX.21, las señales correspondientes a la matriz presentan un conjunto de relaciones m/z hasta, aproximadamente, 600 Da, por lo que los espectros de masas de las muestras de biodiésel se estudiarán a partir de esta relación m/z , con objeto de evitar las interferencias espectrales correspondientes a especies presentes en la matriz utilizada.

IX.3.2 Fingerprints o huellas dactilares de las muestras de biodiésel

Uno de los objetivos del análisis de las muestras de biodiésel por MALDI-TOF MS consistió en verificar que la reacción de transesterificación se había producido correctamente, ya que en dichas muestras no deberían detectarse la presencia de señales de triglicéridos, aunque tampoco es deseable que se detecten señales correspondientes a mono y/o diglicéridos. De acuerdo con la norma europea UNE-EN 14105:2003, el contenido de di y triglicéridos en un biodiésel no debe ser superior a 0,20 % (m/m). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante GC-FID descritos en la sección V.3, se podría afirmar que el

contenido en estas especies debería ser inferior al valor máximo establecido por la norma, ya que el contenido en FAMES de la mayoría de las muestras de biodiesel analizadas fue superior al 99,0 %. Sin embargo, los análisis realizados sólo permitieron realizar una caracterización cualitativa de las muestras estudiadas.

En la Figura IX.22 se presenta el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF MS, en el intervalo de $600 \leq m/z \leq 1000$ Da, para la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de oliva sin usar, según las condiciones experimentales optimizadas de la matriz y las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

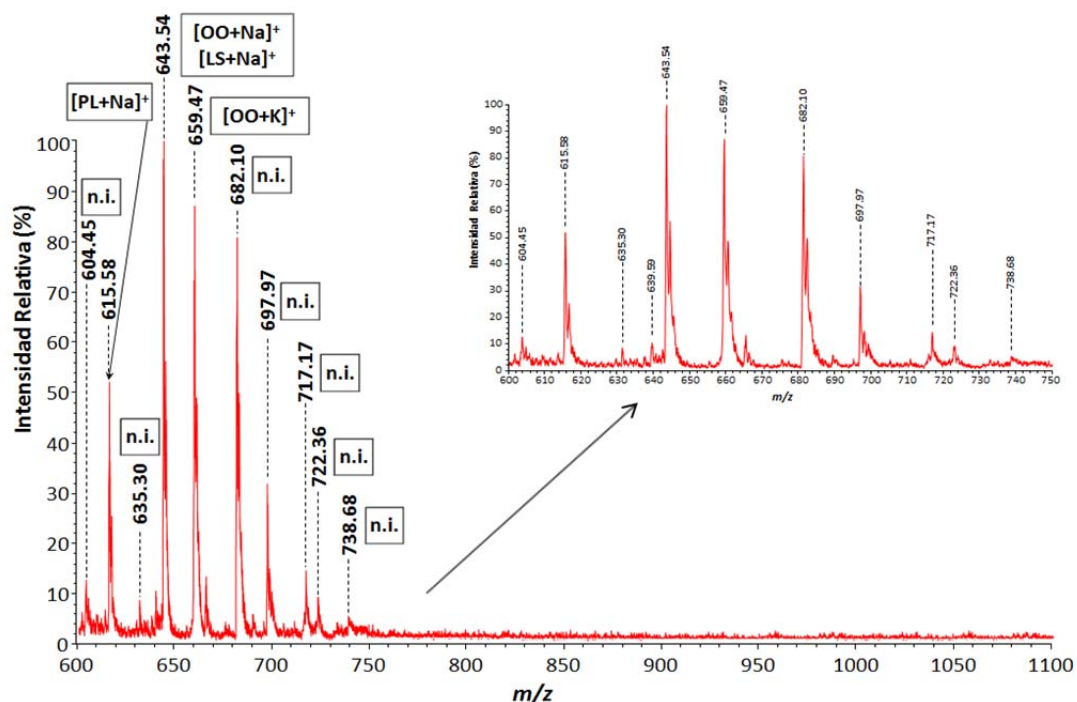


Figura IX.22.- Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS para la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de oliva sin usar, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

En el espectro de masas de la Figura IX.22 se observa un conjunto de señales m/z entre 600 y 750 Da, siendo las de mayor intensidad relativa las correspondientes a relaciones m/z de 643,54; 659,47 y 682,10 Da. En base a los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de aceite de oliva sin usar, las señales con relaciones m/z correspondientes a 615,58 y 643,54 Da se pueden asignar a los diglicéridos sodiados 1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol y 1,2-dioleína o 1-linoleoil-2-estearoil-glicerol, respectivamente y la señal con una relación m/z de 659,47 Da al diglicérido de potasio 1,2-dioleína (Tabla IX.4), mientras que el resto de señales que se observan en la Figura IX.22 no pudieron ser identificadas. Sin embargo, cabe destacar que, como se verá más adelante, éste será el comportamiento o tendencia de las señales presentes en los espectros de masas que presentan todas las muestras de biodiesel estudiadas, independientemente de la materia prima empleada (aceite sin usar o de fritura), por lo que se podría afirmar que este conjunto de señales es característico de las muestras de biodiesel.

Del mismo modo, en la Figura IX.22 se observa la ausencia de señales con relaciones m/z correspondientes a los triglicéridos, en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 850 y 950 Da, por lo que la técnica MALDI-TOF MS podría ser empleada para determinar de forma cualitativa la autenticidad de una muestra de biodiesel. A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que la ausencia de señales en esta región del espectro de masas, se debe a que en la reacción de transesterificación se produjo la conversión cuantitativa de los triglicéridos del aceite en FAMES.

En la Figuras IX.23 se muestra el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS, en el intervalo de $600 \leq m/z \leq 1000$ Da, para la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de oliva procedente de procesos de fritura, siguiendo las condiciones experimentales optimizadas de la matriz y las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

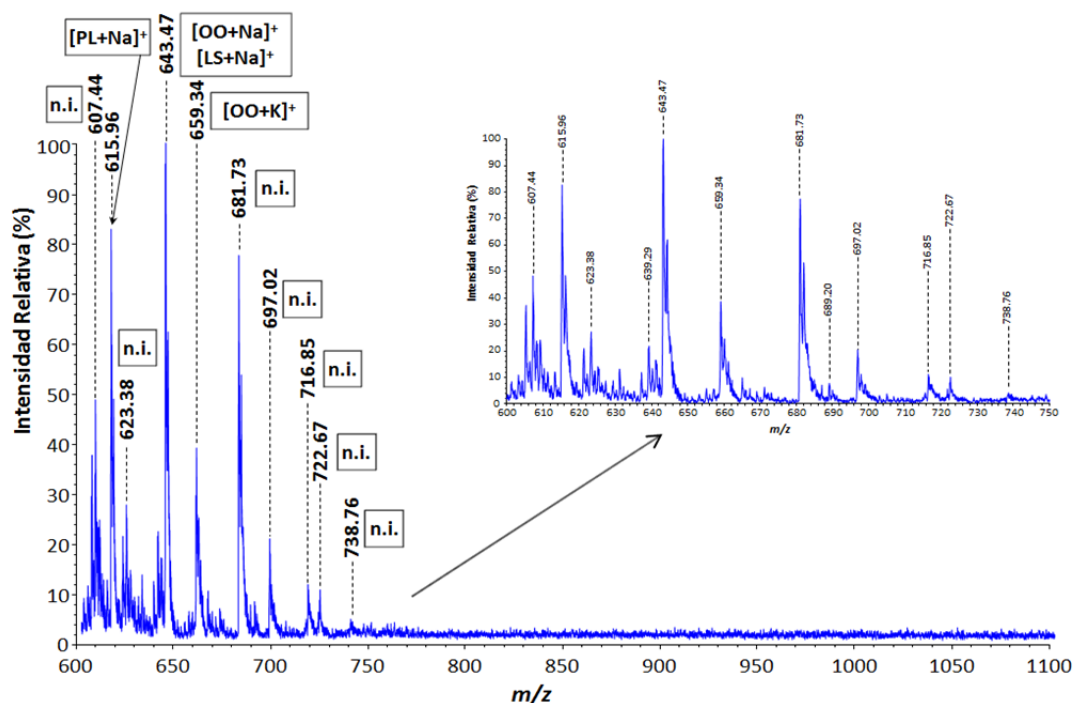


Figura IX.23.- Espectro de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de oliva de fritura, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

Al igual que ocurrió con el espectro de masas de la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva sin usar (Figura IX.22), en este espectro de masas se observa un conjunto de señales en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 600 y 750 Da, apareciendo en este caso las relaciones m/z de 615,96; 643,47 y 681,73 Da como predominantes, y no se observan señales con relaciones m/z en la región correspondiente a los triglicéridos.

En las Figuras IX.24, IX.25 y IX.26 se muestran los espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de girasol, maíz y semillas, respectivamente, tanto sin usar como de fritura, siguiendo las

condiciones experimentales óptimas de la matriz e instrumentales (Tabla III.12 de la sección III.4.6).

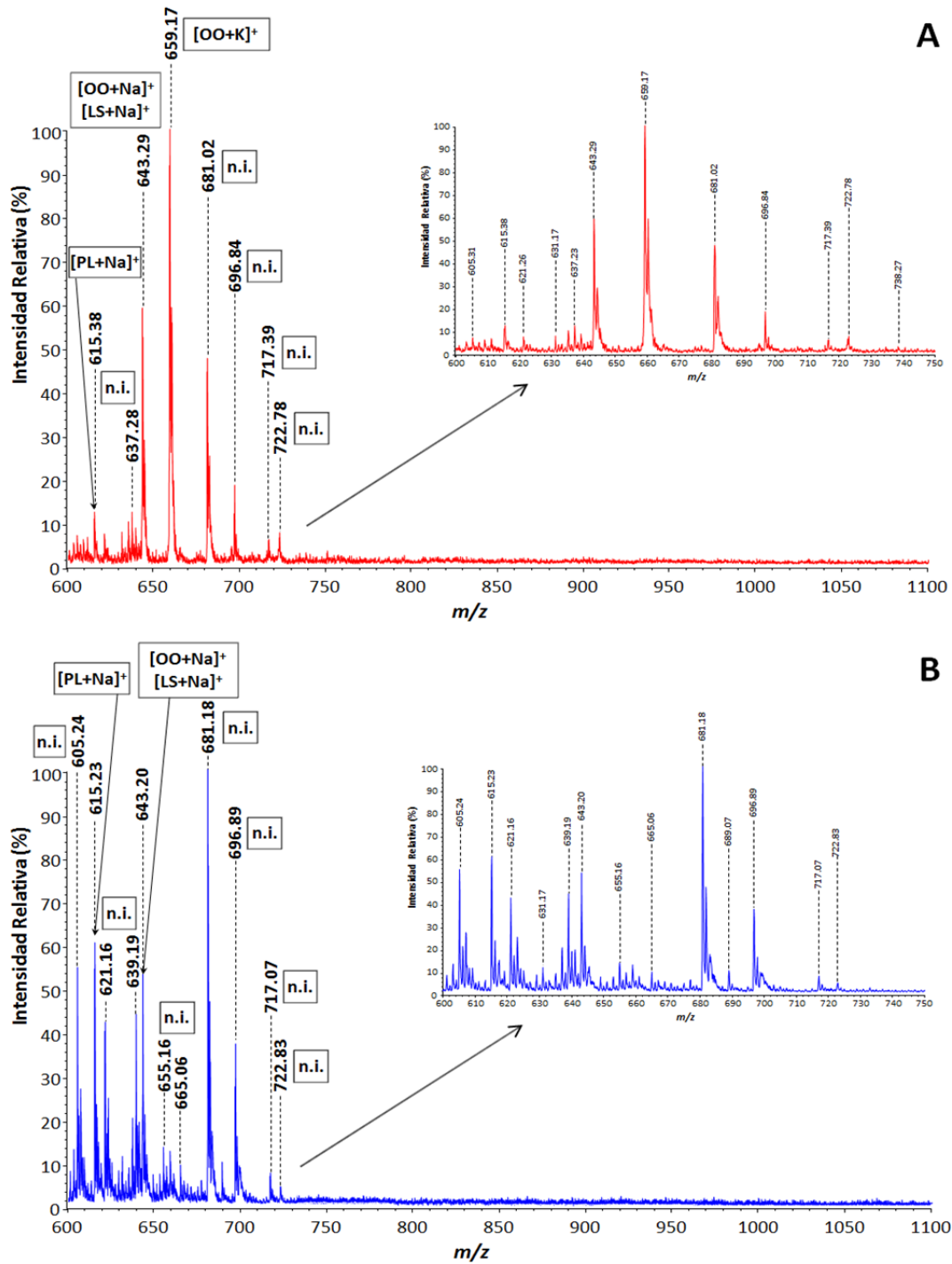


Figura IX.24.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de girasol sin usar (A) y de fritura (B), y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

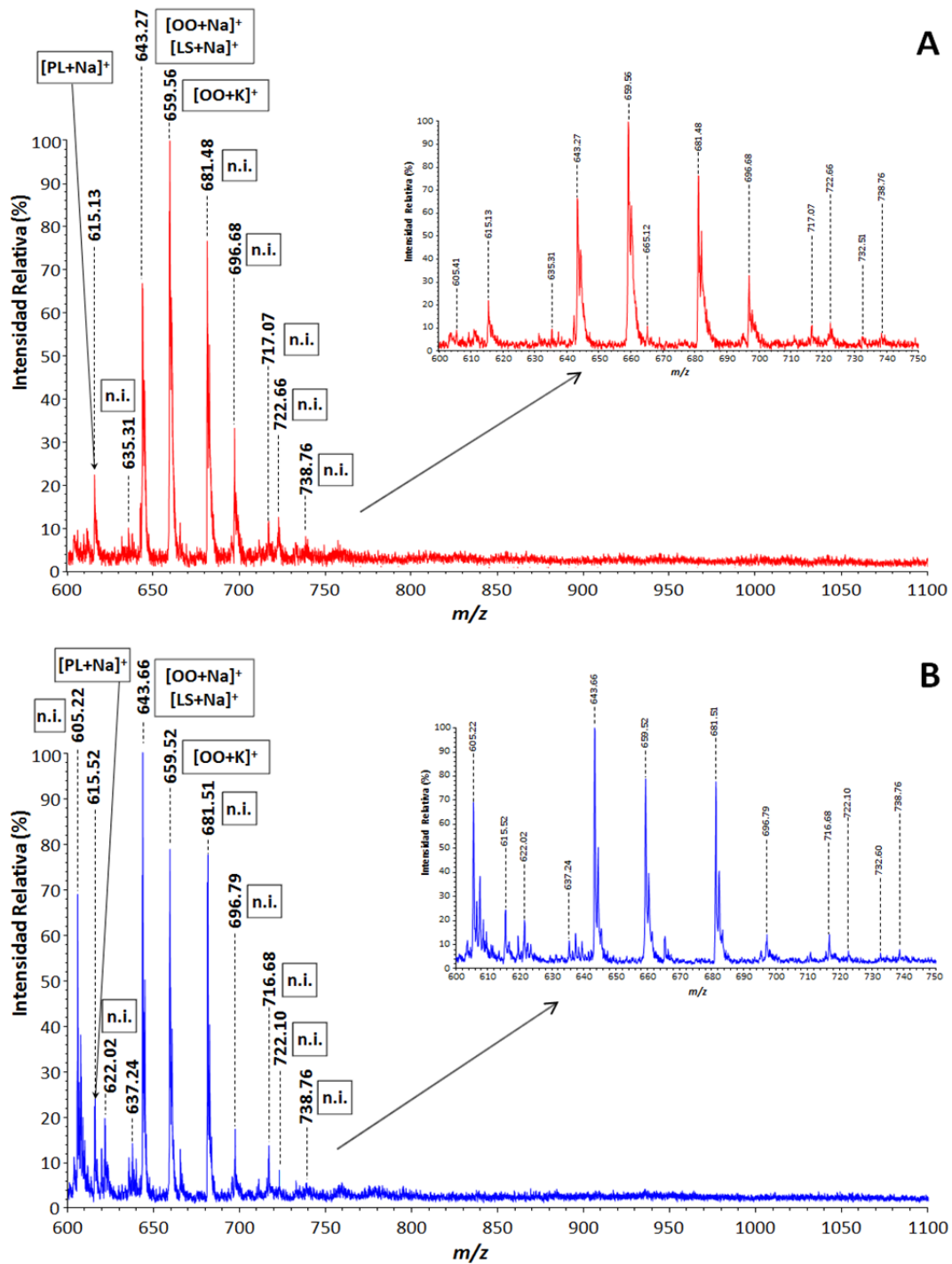


Figura IX.25.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de maíz sin usar (A) y de fritura (B), y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

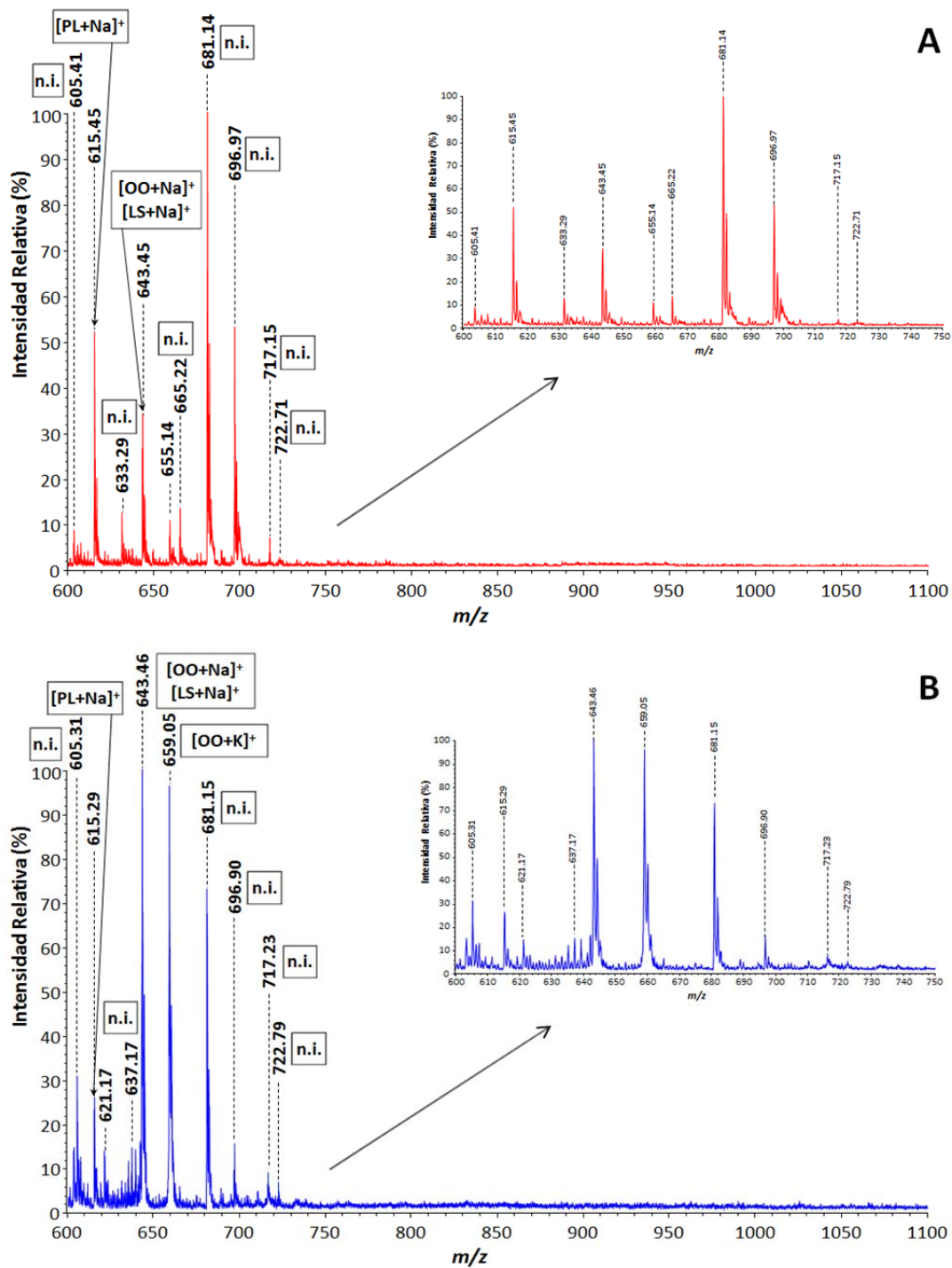


Figura IX.26.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de semillas sin usar (A) y de fritura (B), y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

En general, y como se ha comentado anteriormente, se observa una tendencia similar en las señales que aparecen en los espectros de masas de todas las muestras de biodiesel, independientemente de la materia prima empleada. Un conjunto de señales aparecen en el intervalo entre $600 \leq m/z \leq 750$ Da, variando la señal que presenta la mayor intensidad relativa, y no observándose señales en la región correspondiente a los triglicéridos ($850 \leq m/z \leq 950$ Da).

El espectro de masas de la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de girasol sin usar (Figura IX.24.A) presenta la señal de máxima intensidad relativa a una relación m/z de 659,17 Da, mientras que en el espectro de masas de la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de girasol de fritura (Figura IX.24.B) la máxima intensidad relativa se obtuvo para la señal que presenta una relación m/z de 681,18 Da. Además, cabe destacar que se observa una mayor intensidad relativa de las señales en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 605 y 640 Da en el espectro de la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de girasol de fritura (Figura IX.24.B).

En cuanto a los espectros de masas de las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de maíz sin usar y de fritura, se observa que las señales más intensas se obtienen a relaciones m/z de 643,27; 659,56 y 681,48 Da para el biodiesel producido a partir de aceite de maíz sin usar (Figura IX.25.A) y para el biodiesel producido a partir de aceite de maíz de fritura (Figura IX.25.B), las señales que presentan mayor intensidad relativa se obtienen a relaciones m/z de 643,66; 659,52 y 681,51 Da. Cabe destacar que la señal de 643,27 Da es la más intensa en el espectro del biodiesel de aceite de maíz sin usar mientras que la señal con una relación m/z de 659,52 Da es la más intensa en el espectro del biodiesel de aceite de maíz de fritura. Por otro lado, en el espectro del biodiesel de aceite de maíz de fritura aparece una señal a una m/z de 605,22 Da, que es la cuarta en intensidad, pero que no aparece en el espectro del biodiesel de aceite de maíz sin usar.

Finalmente, el espectro de masas de la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de semillas sin usar (Figura IX.26.A) presenta la señal de máxima intensidad relativa a una relación m/z de 681,14 Da, seguida de dos señales a m/z de 615,45 y 696,97 Da de similar intensidad entre sí pero de la mitad de intensidad que la primera. Por otro lado, en el espectro de la muestra de biodiesel producido a partir de aceite de semillas de fritura se observa que las señales más intensas se producen a relaciones m/z de 643,46; 659,05 y 681,15 Da.

Por lo tanto, se puede afirmar que la reacción de transesterificación ha sido cuantitativa en el caso de estas seis muestras de biodiesel, puesto que no se han encontrado señales con relaciones m/z correspondientes a triglicéridos. Además, se observa que, aunque el comportamiento o tendencia de los espectros de masas es similar, existen diferencias en cuanto a las intensidades relativas de las señales en función del tipo de aceite utilizado para la producción de biodiesel, es decir, el *fingerprint* de cada muestra es distinto, por lo que el

empleo de esta metodología permitiría clasificar una muestra de biodiesel en función de la materia prima con la que se ha producido.

En las Figuras IX.27 y IX.28 se muestran los espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de colza y soja-girasol, respectivamente, tanto sin usar como de fritura.

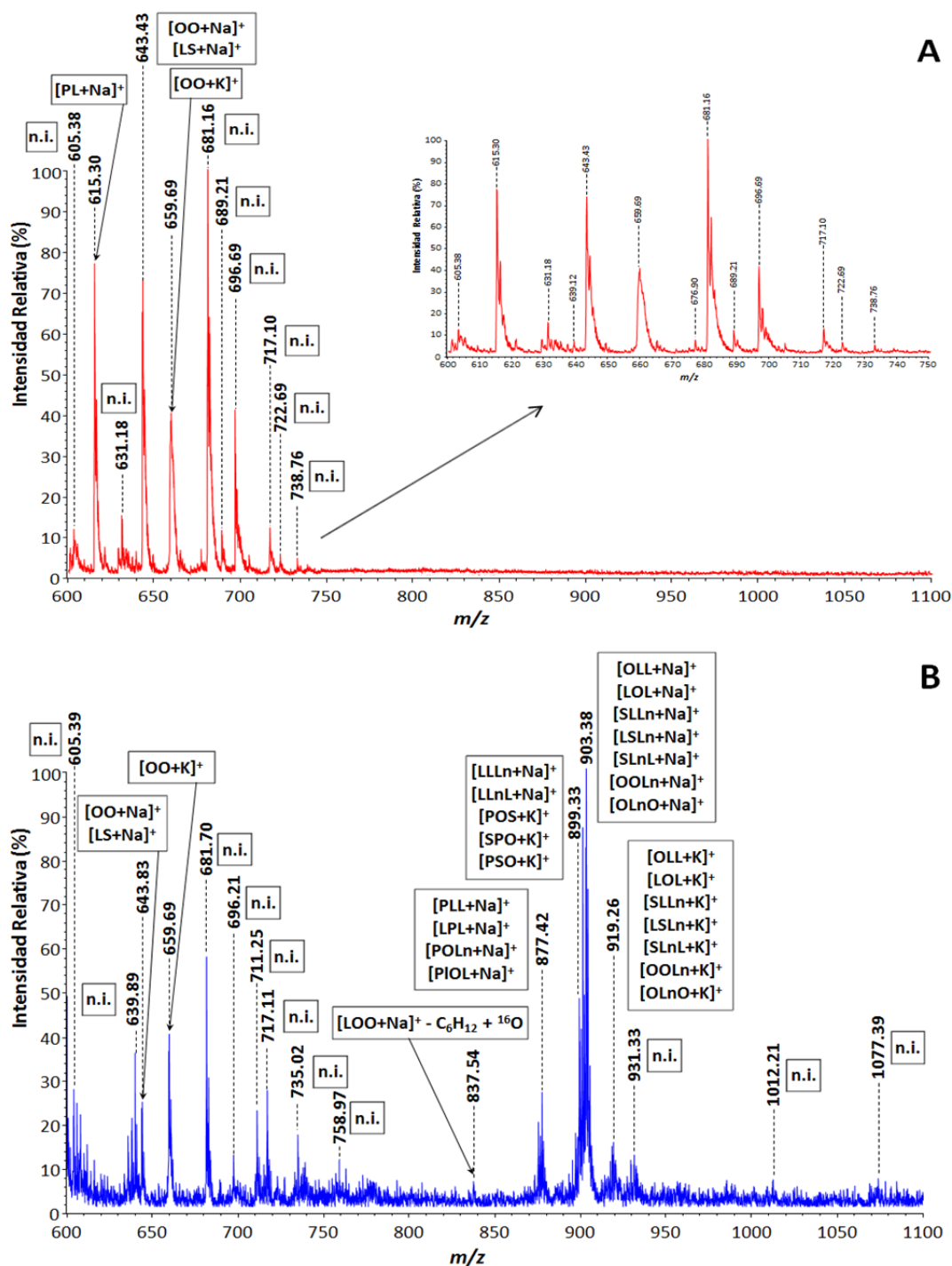


Figura IX.27.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de colza sin usar (A) y de fritura (B), y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

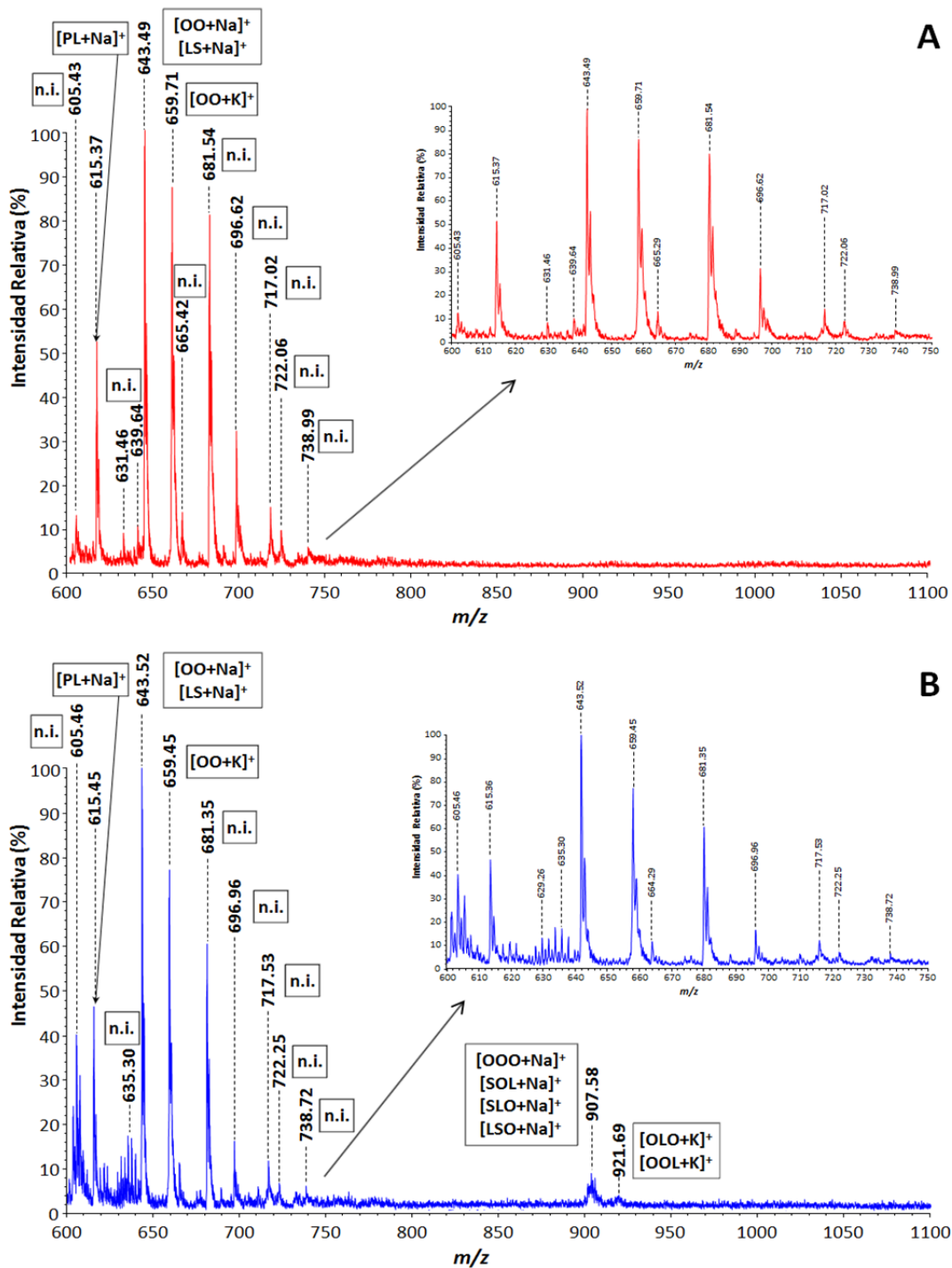


Figura IX.28.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de soja-girasol sin usar (A) y de fritura (B), y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

A diferencia de los casos anteriores, en la Figura IX.27.B se observa que la muestra de biodiesel de aceite de colza de fritura presenta una serie de señales para relaciones m/z superiores a 750 Da. Las relaciones m/z comprendidas entre 870 y 940 Da se corresponden con los triglicéridos identificados en la muestra de aceite de colza de fritura (Tabla IX.10), por lo que se puede afirmar que, en este caso, la reacción de transesterificación ha sido incompleta. Estos resultados confirman los obtenidos mediante GC-FID, ya que el porcentaje de FAMES encontrado (94,3 %) estaba por debajo del límite mínimo establecido en la norma europea UNE-EN 14214:2009. Por otro lado, en el espectro de masas de la muestra de biodiesel de aceite de colza sin usar (Figura IX.27.A) no se observan estas señales correspondientes a triglicéridos, siendo la reacción de transesterificación completa en este caso. La máxima intensidad relativa observada en este espectro de masas se produjo para la relación m/z de 681,16 Da, seguida por las relaciones m/z de 615,30 y 643,43 Da.

De modo similar, en el espectro de masas de la muestra de biodiesel de aceite de soja-girasol de fritura (Figura IX.28.B) se observan dos señales centradas en relaciones m/z de 907,58 y 921,69 Da, correspondientes a los triglicéridos identificados en esta muestra de aceite (Tabla IX.10). El porcentaje de FAMES obtenido para esta muestra de aceite mediante GC-FID fue de 96,6 %, encontrándose dentro de los valores mínimos establecidos en la normativa (concentración de FAMES superior al 96,5 %), y el análisis mediante MALDI-TOF MS ha confirmado la presencia de restos de triglicéridos, lo que indica que la reacción de transesterificación no se completó en su totalidad. Por otro lado, tanto en el espectro de la muestra de biodiesel de aceite de soja-girasol sin usar (Figura IX.28.A) como de fritura (Figura IX.28.B), la señal de mayor intensidad relativa se presenta para la relación m/z de 643 Da aproximadamente, seguidas por las relaciones m/z de 659 y 681 Da, aproximadamente, siendo estas dos últimas más intensas para la muestra de biodiesel de aceite de soja-girasol sin usar que para el biodiesel procedente de aceite de soja-girasol de fritura.

El análisis de las muestras de biodiesel producidas a partir de mezclas de aceites de fritura proporcionó resultados similares a los hallados para las muestras de biodiesel producidas a partir de los aceites individuales. En la Figura IX.29 se muestran los espectros de masas obtenidos, mediante MALDI-TOF MS, para las muestras de biodiesel producidas a partir de una mezcla de aceite de oliva y girasol de fritura y de una mezcla de aceite de oliva, girasol y maíz de fritura, respectivamente.

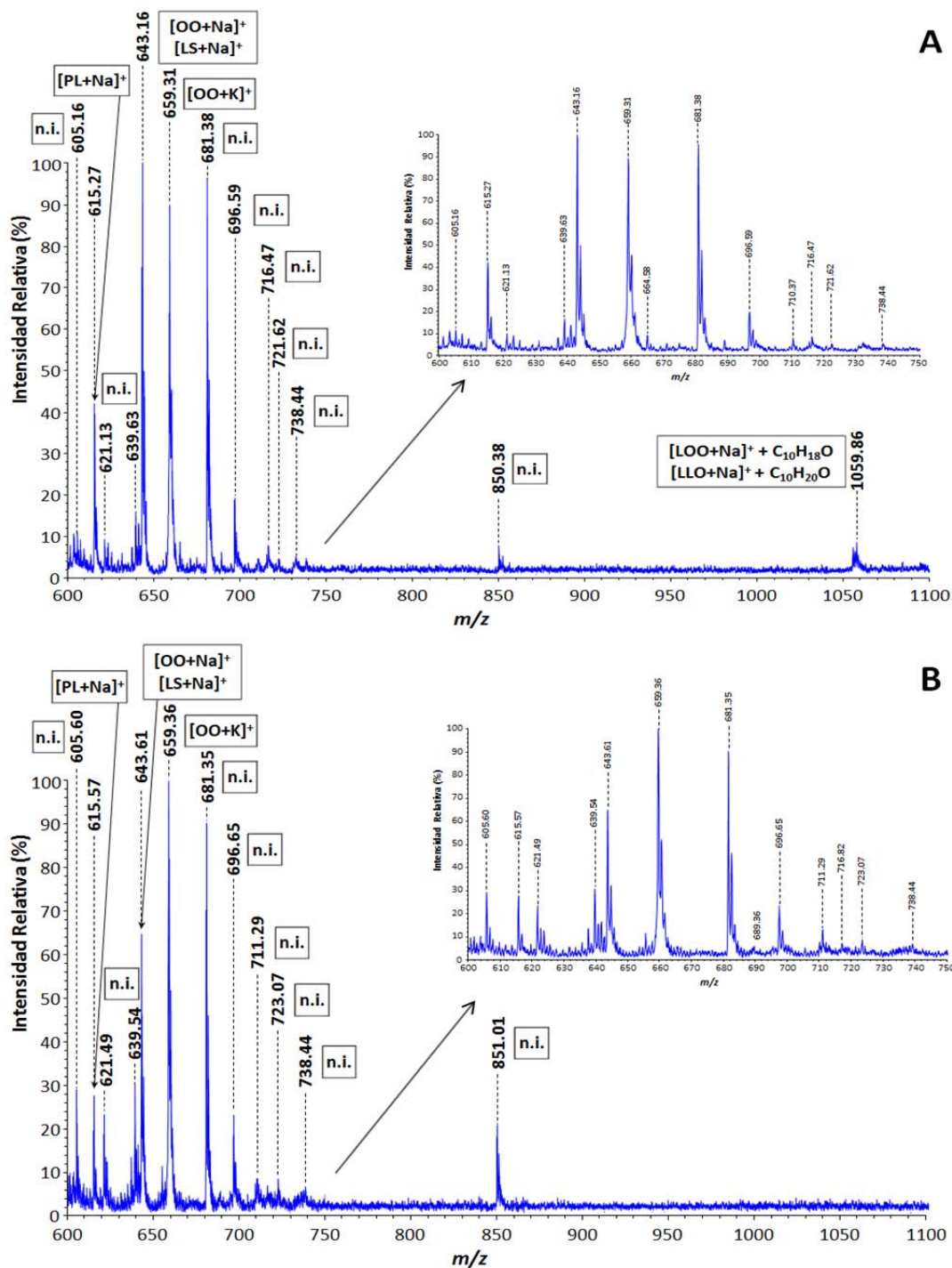


Figura IX.29.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para las muestras de biodiesel producidas a partir de aceite de oliva-girasol de fritura (A) y de oliva-girasol-maíz de fritura (B), y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

En los espectros de la Figura IX.29 se distingue el mismo conjunto de señales, en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 600 y 750 Da, que fue observado para todas las muestras de biodiesel analizadas. En el espectro de masas obtenido para la muestra de biodiesel producida a partir de aceite de oliva-girasol de fritura (Figura IX.29.A), las señales de mayor intensidad relativa se corresponden nuevamente con las relaciones m/z de 643,16;

681,38 y 659,31 Da, mientras que para la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva-girasol-maíz de fritura (Figura IX.29.B), las señales más intensas se corresponden con las relaciones m/z de 659,36; 681,35 y 643,61 Da, en orden creciente de intensidad relativa.

Por otro lado, en el espectro de la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva-girasol de fritura (Figura IX.29.A) aparece una señal con relación m/z de 850,38 Da, que no pudo ser identificada, y un agrupamiento de señales centradas en 1059,86 Da, que se puede atribuir a triglicéridos acoplados con fragmentos de la β -escisión homolítica producida por la reacción de oxidación de los triglicéridos, en concreto con los triglicéridos sodiados 1,2-dioleoil-3-linoleoil-glicerol conteniendo el 2-decenal o el 1-oleoil-2,3-dilinoil-glicerol conteniendo el decanal (Tabla IX.9). En el espectro de masas de la muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de oliva-girasol-maíz de fritura (Figura IX.29.B), se observa una señal con relación m/z de 851,01 Da que no se pudo identificar.

De esta forma, se han establecidos los *fingerprints* característicos de las diferentes muestras de biodiesel estudiadas, producidas a partir de diversos tipos de aceites, observándose que en los espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS, en el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 600 y 750 Da, las señales se presentaban a la misma relación m/z pero con diferentes intensidades relativas, en función del tipo o mezcla de aceite empleado para su producción.

IX.4 Estudio de la adulteración de muestras de biodiesel

Con objeto de comprobar si el método propuesto para la caracterización de las muestras de biodiesel permite detectar la presencia de aceites vegetales en su composición y, por lo tanto, adulteraciones de éste con su materia prima, se realizaron una serie de experiencias consistentes en la mezcla de una muestra de biodiesel con su aceite de procedencia. Así, la detección cualitativa de triglicéridos, fundamentalmente, en el análisis de biodiesel permitiría detectar de forma rápida la práctica fraudulenta en la producción de biodiesel y evitar la comercialización del biodiesel adulterado con aceites vegetales.

Para ello, utilizando las condiciones optimizadas para la matriz (10,0 mg de DHB disueltos en 1,0 mL de acetona con 0,75 % de TFA) y dilución de las mezclas al 1,0 % (v/v) en cloroformo, se seleccionaron tres muestras de biodiesel, producidas a partir de aceite de oliva, girasol y maíz sin usar, y se analizaron mediante la metodología desarrollada diez mezclas de biodiesel y aceite en distintas proporciones, desde una mezcla del 1,0 % de biodiesel y 99,0 % de aceite hasta una mezcla del 80,0 % de biodiesel y 20,0 % de aceite. Todos los análisis se realizaron siguiendo las condiciones instrumentales óptimas recogidas en la Tabla III.12 de la sección III.4.6.

En la Figura IX.30 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de masas obtenidos para algunas mezclas de biodiesel de aceite de oliva sin usar con aceite de oliva sin usar, en distintas proporciones.

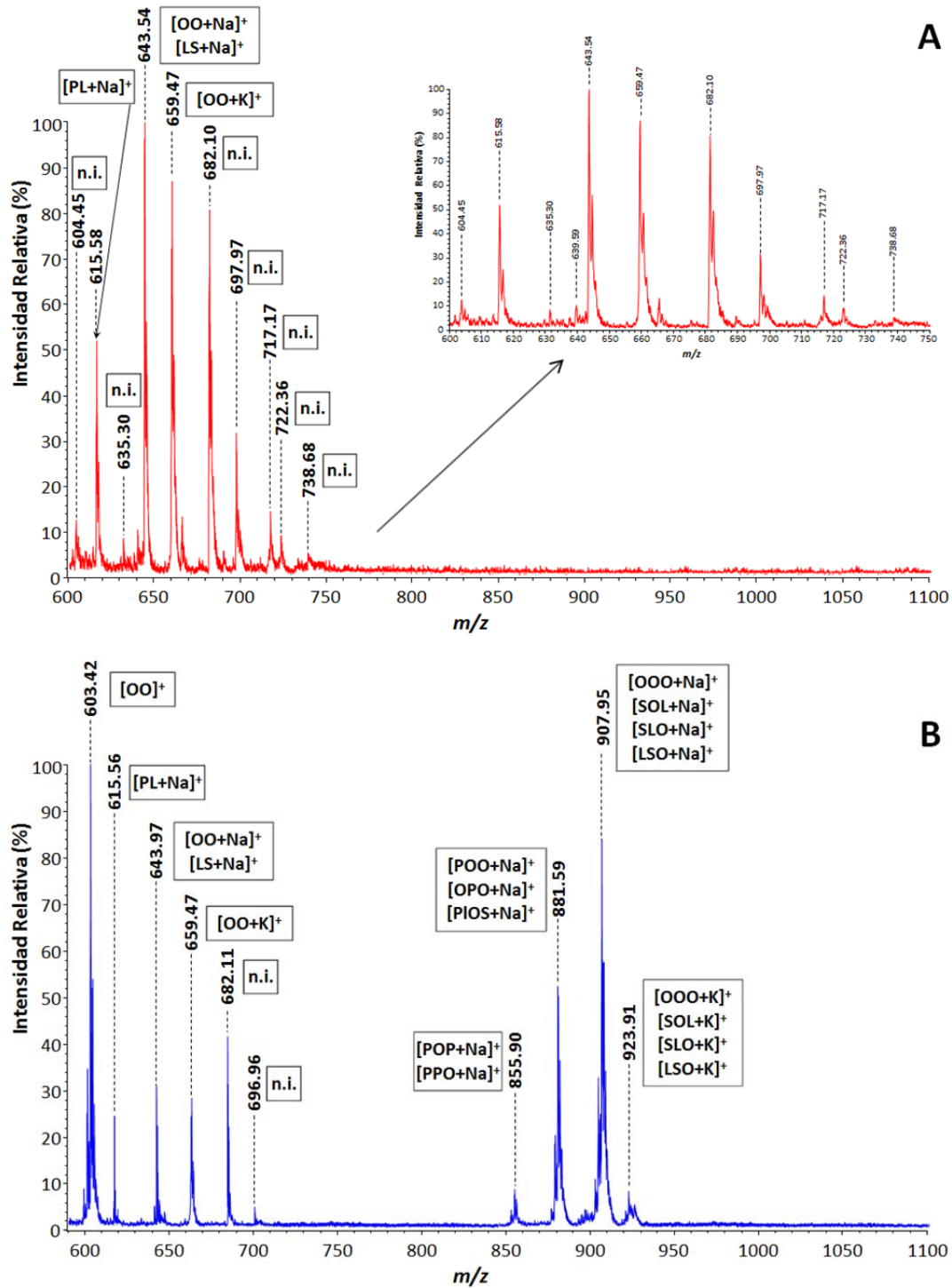
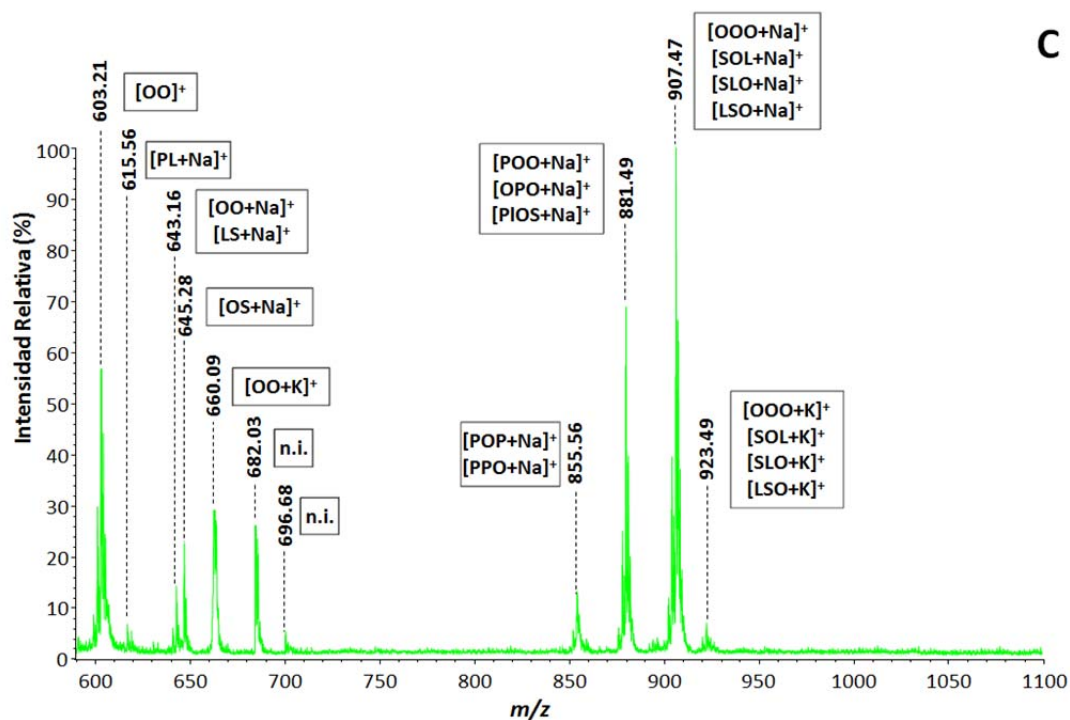


Figura IX.30.- Espectro de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para (A) la muestra de biodiesel de aceite de oliva sin usar, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias; (B) la mezcla al 50,0 % de biodiesel de aceite de oliva sin usar con aceite de oliva sin usar. (n.i. = no identificado).



Cont. Figura IX.30.- Espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para (C) la mezcla al 20,0 % de biodiesel de aceite de oliva sin usar con aceite de oliva sin usar, y asignaciones realizadas para las señales mayoritarias. (n.i. = no identificado).

En el espectro de masas obtenido para la mezcla al 50,0 % de biodiesel de aceite de oliva sin usar con aceite de oliva sin usar (Figura IX.30.B), se observan las relaciones m/z correspondientes a la muestra de biodiesel de aceite de oliva sin usar (Figura IX.30.A) junto con una serie de señales m/z asociadas a los triglicéridos determinados en la muestra de aceite de oliva sin usar (Tabla IX.5). Asimismo, al disminuir el porcentaje de biodiesel y aumentar el de aceite (Figura IX.30.C), se aprecia una disminución en la intensidad de las señales correspondientes al biodiesel, entre el intervalo de relaciones m/z comprendido entre 600 y 750 Da, mientras que las señales correspondientes a los triglicéridos, procedentes del aceite de oliva sin usar, siguen apareciendo, en algunos casos con mayor intensidad relativa.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método desarrollado para el análisis de biodiesel mediante MALDI-TOF MS se podría emplear para detectar, de forma cualitativa, la presencia de triglicéridos en el biodiesel y evitar así la comercialización de biodiesel adulterado con aceites vegetales.

IX.5 Conclusiones

- La técnica MALDI-TOF MS constituye una alternativa novedosa en el estudio de aceites y biodiesel. En los estudios de caracterización de aceites y biodiesel, los espectros de masas son de gran utilidad como huellas dactilares o *fingerprints*. Esta metodología analítica es relativamente simple, ya que para su aplicación no se requiere un tratamiento previo de la muestra y el tiempo de análisis es corto.

● Se han optimizado las condiciones experimentales, donde la composición de la matriz juega un papel muy importante. La matriz óptima para el análisis de las muestras de aceite está constituida por 10,0 mg de DHB disueltos en 1,0 mL de acetona y 0,25 % de TFA; mientras que para las muestras de biodiesel fue necesario incrementar el porcentaje de TFA hasta un 0,75 %.

● El análisis de las muestras de aceite mediante MALDI-TOF MS ha permitido identificar las especies que, de forma mayoritaria, están presentes en todas las muestras de aceite estudiadas (di y triglicéridos), poniéndose de manifiesto la concordancia entre los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS y GC-FID (Capítulo V). Asimismo, en los aceites procedentes de procesos de fritura se ha detectado la presencia de productos de degradación procedentes de la β -escisión homolítica, así como agrupamientos o especies formadas por unión de los triglicéridos a estos productos de degradación.

● Se ha comprobado que el empleo de ciertas matrices en la técnica MALDI-TOF MS dificulta la detección de los diferentes FAMES de las muestras de biodiesel, ya que estos compuestos presentan unas relaciones m/z bajas (inferiores a 400 Da).

● La técnica MALDI-TOF MS permite seguir de forma rápida y efectiva la reacción de transesterificación, ya que en las muestras de biodiesel no deben estar presentes los triglicéridos. La presencia de triglicéridos, los cuales son rápidamente identificables a partir de las relaciones m/z correspondientes, en una muestra biodiesel pondría de manifiesto que la reacción de transesterificación no ha sido cuantitativa.

● La técnica MALDI-TOF MS permite detectar posibles adulteraciones en muestras de biodiesel debido a mezclas con el aceite vegetal de procedencia.

BIBLIOGRAFÍA



- ABNT NBR 7148:2001. Petroleum and petroleum products. Determination of density, relative density and API gravity. Hydrometer method.
- ABNT NBR 9842:2009. Petroleum products. Determination of ash.
- ABNT NBR 10441:2007. Petroleum products. Transparent and opaque liquids. Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity.
- ABNT NBR 14065:2006. Petroleum distillates and viscous oils. Determination of density and relative density by digital densimeter.
- ABNT NBR 14359:2005. Petroleum products. Determination of corrosiveness by the copper strip method.
- ABNT NBR 14448:2009. Petroleum products. Determination of acid number by potentiometric titration.
- ABNT NBR 14598:2007. Petroleum products. Determination of the flash-point by Pensky-Martens closed cup.
- ABNT NBR 14747:2008. Diesel oil. Determination of cold filter plugging.
- ABNT NBR 15341:2006. Biodiesel. Determination of free glycerol in castor oil biodiesels by gas chromatography.
- ABNT NBR 15342:2009. Biodiesel. Determination of monoglycerides, diglycerides content of castor oil biodiesel by gas chromatography.
- ABNT NBR 15343:2009. Biodiesel. Determination of methanol or/and ethanol concentrations in fatty acid esters (biodiesels) by gas chromatography.
- ABNT NBR 15344:2006. Biodiesel. Determination of total glycerin and triglycerides contents in castor oil biodiesel.
- Abreu, F.R.; Lima, D.G.; Hamú, E.H.; Wolf, C.; Suarez, P.A.Z. (2004) "Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **209** (1-2), 29-33.
- Abdullah, A.Z.; Razali, N.; Mootabadi, H.; Salamatinia, B. (2007) "Critical technical areas for future improvement in biodiesel technologies". *Environmental Research Letters*, **2** (3), 1-6.
- Adam, F.; Bertoncini, F.; Coupard, V.; Charon, N.; Thiébaud, D.; Espinat, D.; Hennion, M.C. (2008) "Using comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of oxygenates in middle distillates: I. Determination of the nature of biodiesels blend in diesel fuel". *Journal of Chromatography A*, **1186** (1-2), 236-244.
- Adebajo, A.; Kulkarni, M.G.; Dalai, A.K.; Bakhshi, N.N. (2007) "Pyrolysis of waste fryer grease in a fixed-bed reactor". *Energy & Fuels*, **21** (2), 828-835.
- Agarwal, A.K.; Das, L.M. (2001) "Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines". *Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, **123** (2), 440-447.
- Agarwal, A.K. (2007) "Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines". *Progress in Energy and Combustion Science*, **33** (3), 233-271.
- Ahmad, A.L.; Mat Yasin, N.H.; Derek, C.J.C.; Lim, J.K. (2011) "Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**(1), 584-593.
- Akoh, C.C.; Chang, S.W.; Lee, G.C.; Shaw, J.F. (2007) "Enzymatic approach to biodiesel production". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (22), 8995-9005.
- Alberici, R.M.; Simas, R.C.; de Souza, V.; de Sá, G.F.; Daroda, R.J.; Eberlin, M.N. (2010) "Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, **659** (1-2), 15-22.
- Albuquerque, M.C.G.; Machado, Y.L.; Torres, A.E.B.; Azevedo, D.C.S.; Cavalcante Jr., C.L.; Firmiano, L.R.; Parente Jr, E.J.S. (2009) "Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends". *Renewable Energy*, **34** (3), 857-859.
- Alcantara, R.; Amores, J.; Canoira, L.; Fidalgo, E.; Franco, M.J.; Navarro, A. (2000) "Catalytic production of biodiesel from soybean oil, used frying oil and tallow". *Biomass and Bioenergy*, **18** (1), 515-527.
- Allawzi, M.; Kandah, M.I. (2008) "Parametric study of biodiesel production from used soybean oil". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110** (8), 760-767.
- Al-Saad, K.A.; Zabrouskov, V.; Siems, W.F.; Knowles, N.R.; Hannan, R.M.; Hill, H.H.Jr. (2003) "MALDI-TOF mass spectrometry of lipids: Ionization and prompt fragmentation patterns". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17** (1), 87-96.
- Alptekin, E.; Canakci, M. (2008) "Determination of the density and the viscosities of biodiesel-diesel fuel blends". *Renewable Energy*, **33** (12), 2623-2630.
- Altin, R.; Çetinkaya, S.; Yücesu, H.S. (2001) "The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines". *Energy Conversion and Management*, **42** (5), 529-538.

- Amais, R.S.; Garcia, E.E.; Monteiro, M.R.; Nogueira, A.R.A.; Nóbrega, J.A. (2010) "Direct analysis of biodiesel microemulsions using an inductively coupled plasma mass spectrometry". *Microchemical Journal*, **96** (1), 146-150.
- Angioni, A.; Cabitza, M.; Russo, M.T.; Caboni, P. (2006) "Influence of olive cultivars and period of harvest on the contents of Cu, Cd, Pb, and Zn in virgin olive oils". *Food Chemistry*, **99** (3), 525-529.
- Ansari, R.; Kazi, T.G.; Jamali, M.K.; Arain, M.B.; Wagan, M.D.; Jalbani, N.; Afridi, H.I.; Shah, A.Q. (2009) "Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique". *Food Chemistry*, **115** (1), 318-323.
- Antolin, G.; Tinaut, F.V.; Briceño, Y.; Castaño, V.; Pérez, C.; Ramirez, A.I. (2002) "Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification". *Bioresource Technology*, **83** (2), 111-114.
- Anwar, F.; Rashid, U.; Ashraf, M.; Nadeem, M. (2010) "Okra (*Hibiscus esculentus*) seed oil for biodiesel production". *Applied Energy*, **87** (3), 779-785.
- Aparicio, R.; Harwood, J. (Eds.) (2000) "Handbook of olive oil analysis and properties". Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland. Hardcover, 1st edition. Springer. ISBN 10: 0834216337.
- Aparicio, R.; Harwood, J. (2003) "Manual del aceite de oliva". AMV Ediciones, 1ª ed. ISBN: 9788484760382.
- APPA Biocarburantes (2008) "Informe sobre la capacidad, producción y consumo de biocarburantes en España. Situación y perspectivas". (<http://www.appa.es>).
- Araujo, P.; Zeng, Y.; Du, Z.Y.; Nguyen, T.T.; Frøyland, L.; Grung, B. (2010) "Discrimination of n-3 rich oils by gas chromatography". *Lipids*, **45** (12), 1147-1158.
- Agarwal, A.K. (2007) "Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines". *Progress in Energy and Combustion Science*, **33** (3), 233-271.
- Armenta, R.E.; Scott, S.D.; Burja, A.M.; Radianingtyas, H.; Barrow, C.J. (2009) "Optimization of fatty acid determination in selected fish and microalgal oils". *Chromatographia*, **70** (3-4), 629-636.
- Arquiza, A.C.; Bayungan, M.C.; Tan, R. (2009) "Production of biodiesel and oleochemicals from used frying oil". University of Philippines, Los Baños. (www.people.cornell.edu/pages/jaa56).
- Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. (1990) "Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers". *Analytical Chemistry*, **62** (19), 2145-2148.
- Asbury, G.R.; Al-Saad, K.; Siems, W.F.; Hannan, R.M.; Hill, H.H. Jr. (1999) "Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **10** (10), 983-991.
- ASTM D86-09e1 Standard Test Method for Distillation of Petroleum Products at Atmospheric Pressure.
- ASTM D93-09 Standard Test Methods for Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester.
- ASTM D130-04 Standard Test Method for Corrosiveness to Copper from Petroleum Products by Copper Strip Test.
- ASTM D130-04e1 Standard Test Method for Corrosiveness to Copper from Petroleum Products by Copper Strip Test.
- ASTM D445-09 Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity).
- ASTM D613-08 Standard Test Method for Cetane Number of Diesel Fuel Oil.
- ASTM D664-09a Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration.
- ASTM D874-07 Standard Test Method for Sulfated Ash from Lubricating Oils and Additives.
- ASTM D976-06 Standard Test Method for Calculated Cetane Index of Distillate Fuels.
- ASTM D1160-06 Standard Test Method for Distillation of Petroleum Products at Reduced Pressure.
- ASTM D1298-99(2005) Standard Test Method for Density, Relative Density (Specific Gravity), or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method.
- ASTM D2709-96(2006) Standard Test Method for Water and Sediment in Middle Distillate Fuels by Centrifuge.
- ASTM D4052-09 Standard Test Method for Density, Relative Density, and API Gravity of Liquids by Digital Density Meter.
- ASTM D4530-07 Standard Test Method for Determination of Carbon Residue (Micro Method).
- ASTM D4737-09a Standard Test Method for Calculated Cetane Index by Four Variable Equation.
- ASTM D4951-09 Standard Test Method for Determination of Additive Elements in Lubricating Oils by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry.

- ASTM D5453-09 Standard Test Method for Determination of Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Spark Ignition Engine Fuel, Diesel Engine Fuel, and Engine Oil by Ultraviolet Fluorescence.
- ASTM D6371-05 Standard Test Method for Cold Filter Plugging Point of Diesel and Heating Fuels.
- ASTM D6584-08 Standard Test Method for Determination of Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography.
- ASTM D6751-09 Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels.
- Atadashi, I.M.; Aroua, M.K.; Abdul Aziz, A. (2010) "High quality biodiesel and its diesel engine application: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14 (7)**, 1999-2008.
- Ayorinde, F.O.; Elhilo, E.; Hlongwane, C. (1999a) "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of canola, castor and olive oils". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **13 (8)**, 737-739.
- Ayorinde, F.O.; Eribo, B.E.; Balan, K.V.; Johnson, J.H.Jr.; Wan, L.W. (1999b) "Determination of major triacylglycerol components of polyunsaturated specialty oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **13 (10)**, 937-942.
- Ayorinde, F.O.; Elhilo, E.; Hlongwane, C.; Saeed, K.A. (1999c) "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of *Vernonia galamensis* oil". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76 (10)**, 1217-1220.
- Ayorinde, F.O.; Garvin, K.; Saeed, K. (2000) "Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **14 (7)**, 608-615.
- Azcan, N.; Danisman, A. (2007) "Alkali catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation". *Fuel*, **86 (17-18)**, 2639-2644.
- Azcan, N.; Danisman, A. (2008) "Microwave assisted transesterification of rapeseed oil". *Fuel*, **87 (10-11)**, 1781-1788.
- Azócar, L.; Ciudad, G.; Heipieper, H.J.; Muñoz, R.; Navia, R. (2010) "Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **109 (6)**, 609-614.
- Bakkali, K.; Ballesteros, E.; Souhail, B.; Ramos Martos, N. (2009) "Determinación de trazas metálicas en aceites vegetales de España y Marruecos mediante espectroscopía de absorción con cámara de grafito después de la digestión en horno de microondas". *Grasas y Aceites*, **60 (5)**, 490-497.
- Balat, M.; Balat, H. (2010) "Progress in biodiesel processing". *Applied Energy*, **87 (6)**, 1815-1835.
- Balat, M. (2011) "Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work". *Energy Conversion and Management*, **52 (2)**, 1479-1492.
- Ballesteros, R. (2002) "Análisis experimental de las emisiones de partículas de un motor diesel con combustibles convencionales y alternativos". Tesis Doctoral. Universidad de Castilla La Mancha, España.
- Banerjee, A.; Chakraborty, R. (2009) "Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production - A review". *Resources, Conservation and Recycling*, **53 (16)**, 490-497.
- Baptista, P.; Felizardo, P.; Menezes, J.C.; Neiva Correia, M.J. (2008) "Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting the methyl esters content in biodiesel". *Analytica Chimica Acta*, **607 (2)**, 153-159.
- Baquero, G.; Esteban, B.; R, A.; Riba, J.R.; Puig, R. (2010) "Small-scale production of straight vegetable oil from rapeseed and its use as biofuel in the Spanish territory". *Energy Policy*, **38 (1)**, 189-196.
- Barnes, C.D.; Garwood, D.R.; Price, T.J. (2010) "The use of biodiesel blends in domestic vaporising oil burners". *Energy*, **35 (2)**, 501-505.
- Barnwal, B.K.; Sharma, M.P. (2005) "Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **9 (4)**, 363-378.
- Bautista, L.F.; Vicente, G.; Rodríguez, R.; Pacheco, M. (2009) "Optimisation of FAME production from waste cooking oil for biodiesel use". *Biomass and Bioenergy*, **33 (5)**, 862-872.
- Benedito, J.; Mulet, A.; Velasco, J.; Dobarganes, M.C. (2002) "Ultrasonic assessment of oil quality during frying". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50 (16)**, 4531-4536.
- Benjumea, P.; Agudelo, J.; Agudelo, A. (2009) "Effect of altitude and palm oil biodiesel fuelling on the performance and combustion characteristics of a HSDI diesel engine". *Fuel*, **88 (4)**, 725-731.
- Berchmans, H.J.; Hirata, S. (2008) "Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids". *Bioresource Technology*, **99 (6)**, 1716-1721.

- Bergqvist, M.H.J.; Kaufmann, P. (1993) "A multivariate optimization of triacylglycerol analysis by high-performance liquid chromatography". *Lipids*, **28** (7), 667-675.
- Bernardo, A.; Howard-Hildige, R.; O'Connell, A.; Nichol, R.; Ryan, J.; Rice, B.; Roche, E.; Leahy, J.J. (2003) "Camelina oil as a fuel for diesel transport engines". *Industrial Crops and Products*, **17** (3), 191-197.
- Berrios, M.; Martín, M.A.; Chica, A.F.; Martín, A. (2010) "Obtaining biodiesel from Spanish used frying oil: Issues in meeting the EN 14214 biodiesel standard". *Biomass and Bioenergy*, **34** (3), 312-318.
- Bezerra de Lira, L.F.; Albuquerque, M.S.; Andrade Pacheco, J.G.; Fonseca, T.M.; Cavalcanti, E.H.S.; Stragevitch, L.; Pimentel, M.F. (2010) "Infrared spectroscopy and multivariate calibration to monitor stability quality parameters of biodiesel". *Microchemical Journal*, **96** (1), 126-131.
- Biostab Project (2003) "Stability of biodiesel used as a fuel for diesel engines and heating systems". Presentation of BIOSTAB project results. Published by BLT Wieselburg, Graz, Austria.
- Borges, M.E.; Díaz, L.; Gavín, J.; Brito, A. (2011) "Estimation of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel samples from dynamic viscosity measurements". *Fuel Processing Technology*, **92** (3), 597-599.
- Bouaid, A.; Diaz, Y.; Martinez, M.; Aracil, J. (2005) "Pilot plant studies of biodiesel production using *Brassica carinata* as raw material". *Catalysis Today*, **106** (1-4), 193-196.
- Bouaid, A.; Martinez, M.; Aracil, J. (2007) "Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils". *Fuel*, **86** (16), 2596-2602.
- Bouaid, A.; Martínez, M.; Aracil, J. (2009) "Production of biodiesel from bioethanol and *Brassica carinata* oil: Oxidation stability study". *Bioresource Technology*, **100** (7), 2234-2239.
- Brito, A.; Díaz, F.; Arvelo, R.; Torres, M.; García, F.J.; Borges, M.E.; Díaz, M. C.; Otero, N.; Peña, J. (2004) "Reutilización de aceites vegetales. Problemática en Canarias". Anuario del Instituto de Estudios Canarios, Vol. **XLVII**, 227-246.
- Brito, A.; Arvelo, R.; García, F.J.; García, M.T.; Borges, M.E.; Díaz, M.C.; Otero, N.; García, M.D. (2006) "Transesterification of used vegetable oil to biodiesel. Heterogeneous catalyst". *Trends in Chemical Engineering*, **10**, 77-85.
- Brito, A.; Borges, M.E.; Otero, N. (2007) "Zeolite Y as a heterogeneous catalyst in biodiesel fuel production from used vegetable oil". *Energy & Fuels*, **21**(6), 3280-3283.
- Brito, A.; Borges, M.E.; Garín, M.; Hernández, A. (2009) "Biodiesel production from waste oil using Mg-Al layered double hydroxide catalysts". *Energy & Fuels*, **23** (6), 2952-2958.
- Bruno, T.J.; Wolk, A.; Naydich, A. (2009) "Stabilization of biodiesel fuel at elevated temperature with hydrogen donors: Evaluation with the advanced distillation curve method". *Energy & Fuels*, **23** (2), 1015-1023.
- Calvano, C.D.; Palmisano, F.; Zambonin, C.G. (2005) "Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of triacylglycerols in oils". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19** (10), 1315-1320.
- Campbell, C.J.; Laherrère, J.H. (1998) "The end of cheap oil". *Scientific American*, **278**, 78-83.
- Canakci, M.; Van Gerpen, J. (1999) "Biodiesel production via acid catalysis". *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **42** (5), 1203-1210.
- Canakci, M.; Van Gerpen, J. (2001) "Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids". *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **44** (6), 1429-1436.
- Canakci, M.; Sanli, H. (2008) "Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35** (5), 431-441.
- Canakci, M.; Ozsezen, A.N.; Turkcan, A. (2009) "Combustion analysis of preheated crude sunflower oil in an IDI diesel". *Biomass and Bioenergy*, **33** (5), 760-767.
- Canoira, L.; García Galeán, J.; Alcántara, R.; Lapuerta, M.; García-Contreras, R. (2010) "Fatty acid methyl esters (FAMES) from castor oil: Production process assessment and synergistic effects in its properties". *Renewable Energy*, **35** (1), 208-217.
- Cardone, M.; Prati, M.V.; Rocco, V.; Seggiani, M.; Senatore, A.; Vitolo, S. (2002) "*Brassica carinata* as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: Engine performance and regulated and unregulated exhaust emissions". *Environmental Science and Technology*, **36** (21), 4656-4662.
- Castro, P.; Coello, J.; Castillo, L. (2007) "Opciones para la producción y uso del biodiesel en el Perú". Perú: Soluciones Prácticas. Intermediate Technology Development Group. ISBN 978-9972-47-139-0.
- Catharino, R.R.; Haddad, R.; Cabrini, L.G.; Cunha, I.B.S.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N. (2005) "Characterization of vegetable oils by ESI mass spectrometry fingerprint: Classification, quality, adulteration and aging". *Analytical Chemistry*, **77** (22), 7429-7433.

- Catharino, R.R.; Milagre, H.M.S.; Saraiva, S.A.; Garcia, C.M.; Schuchardt, U.; Eberlin, M.N. (2007) "Biodiesel typification and quality control by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting". *Energy & Fuels*, **21** (6), 3698-3701.
- Çaylı, G.; Küsefoğlu, S. (2008) "Increased yields in biodiesel production from used cooking oils by a two step process: Comparison with one step process by using TGA". *Fuel Processing Technology*, **89** (2), 118-122.
- Çelikten, I.; Koca, A.; Arslan, M.A. (2010) "Comparison of performance and emissions of diesel fuel, rapeseed and soybean oil methyl esters injected at different pressures". *Renewable Energy*, **35** (4), 814-820.
- Cerchiara, T.; Chidichimo, G.; Ragusa, M.I.; Belsito, E.L.; Liguori, A.; Arioli, A. (2010) "Characterization and utilization of Spanish broom (*Spartium junceum* L.) seed oil". *Industrial Crops and Products*, **31** (2), 423-426.
- Cert, A.; Moreda, W.; Pérez-Camino, M.C. (2000) "Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils". *Journal of Chromatography A*, **881** (1-2), 131-148.
- Cerveró, J.M.; Coca, J.; Luque, S. (2008) "Production of biodiesel from vegetable oils". *Grasas y Aceites*, **59** (1), 76-83.
- Cetinkaya, M.; Karaosmanoğlu, F. (2004) "Optimization of base-catalyzed transesterification reaction of used cooking oil". *Energy & Fuels*, **18** (6), 1888-1895.
- Chakrabarti, M.H.; Ali, M.; Baroutian, S.; Saleem, M. (2010) "Techno-economic comparison between B10 of *Eruca sativa* L. and other indigenous seed oils in Pakistan". *Process Safety and Environmental Protection*, **89** (3), 167-171.
- Chakraborty, M.; Baruah, D.C.; Konwer, D. (2009) "Investigation of terminalia (*Terminalia belerica* Robx.) seed oil as prospective biodiesel source for North-East India". *Fuel Processing Technology*, **90** (12), 1435-1441.
- Chang, C.; Chen, J.H.; Chang, C.M.J.; Wu, T.T.; Shieh, C.J. (2009) "Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology". *New Biotechnology*, **26** (3-4), 187-192.
- Chapagain, B.P.; Yehoshua, Y.; Wiesman, Z. (2009a) "Desert date (*Balanites aegyptiaca*) as an arid lands sustainable bioresource for biodiesel". *Bioresource Technology*, **100** (3), 1221-1226.
- Chapagain, B.P.; Wiesman, Z. (2009b) "MALDI-TOF/MS Fingerprinting of Triacylglycerols (TAGs) in Olive oils produced in the israeli negev desert". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (4), 1135-1142.
- Chapman, E.; Hile, M.; Pague, M.; Song, J.; Boehman, A. (2004) "Eliminating the NOx emissions increase associated with biodiesel". The 95th AOCs annual meeting Expo 2004.
- Chaves, E.S.; Saint'Pierre, T.D.; dos Santos, E.J.; Tormen, L.; Bascuñana, V.L.A.F.; Curtius, A.J. (2008a) "Determination of Na and K in biodiesel by flame atomic emission spectrometry and microemulsion sample preparation". *Journal of Brazilian Chemical Society*, **19** (5), 856-861.
- Chaves, E.S.; Lepri, F.G.; Silva, J.S.A.; de Quadros, D.P.C.; Saint'Pierre, T.D.; Curtius, A.J. (2008b) "Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS". *Journal of Environmental Monitoring*, **10**, 1211-1216.
- Chaves, E.S.; dos Santos, E.J.; Araujo, R.G.O.; Oliveira, J.V.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. (2010) "Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS". *Microchemical Journal*, **96** (1), 71-76.
- Chen, C.R.; Wang, C.H.; Wang, L.Y.; Hong, Z.H.; Chen, S.H.; Ho, W.J.; Chang, C.M.J. (2008) "Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil". *The Journal of Supercritical Fluids*, **45** (3), 322-331.
- Chen, Y.; Xiao, B.; Chang, J.; Fu, Y.; Lv, P.; Wang, X. (2009) "Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor". *Energy Conversion and Management*, **50** (3), 668-673.
- Chhetri, A.B.; Watts, K.C.; Islam, M.R. (2008) "Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production". *Energies*, **1** (1), 3-18.
- Chinnasamy, S.; Bhatnagar, A.; Hunt, R.W.; Das, K.C. (2010) "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications". *Bioresource Technology*, **101** (9), 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007) "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology Advances*, **25** (3), 294-306.
- Choe, E.; Min D.B. (2006) "Mechanisms and factors for edible oil oxidation". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5** (4), 169-186.
- Cindric, I.J.; Zeiner, M.; Steffan, I. (2007) "Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GFAAS". *Microchemical Journal*, **85** (1), 136-139.
- Consejo Oleícola Internacional (<http://www.internationaloliveoil.org>).
- COI, 2006. Consejo Oleícola Internacional. COI/T. 15/NC. Norma Comercial Aplicable al Aceite de Oliva y al Aceite de Orujo de Oliva. Nº 3/ Rev 2; 24 de noviembre de 2006.

- COI, 2008. Consejo Oleícola Internacional. COI/T. 15/NC. Norma Comercial Aplicable al Aceite de Oliva y al Aceite de Orujo de Oliva. Nº 3/ Rev 3; 3 de noviembre de 2008.
- Comisión del Codex Alimentarius (<http://www.codexalimentarius.net>)
- Cvacka, J.; Svatos, A. (2003) "Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of lipids and high molecular weight hydrocarbons with lithium 2,5-dihydroxybenzoate matrix". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17 (19)**, 2203-2207.
- Cvangros, J.; Povazanec, F. (1996) "Production and treatment of rapeseed oil methyl esters as alternative fuels for diesel engines". *Bioresource Technology*, **55 (2)**, 145-150.
- Cvangros, J.J.; Cvangrosová, Z. (2004) "Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids". *Biomass and Bioenergy*, **27 (2)**, 173-181.
- Da Silva, N.D.; Maciel, M.R.W.; Batistella, C.B.; Filho, R.M. (2006) "Optimization of biodiesel production from castor oil". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **130 (1-3)**, 405-414.
- Da Silva, J.P.V.; Serra, T.M.; Gossmann, M.; Wolf, C.R.; Meneghetti, M.R.; Meneghetti, S.M.P. (2010) "Moringa oleifera oil: Studies of characterization and biodiesel production". *Biomass & Bioenergy*, **34 (10)**, 1527-1530.
- Dantas, M.B.; Albuquerque, A.R.; Barros, A.K.; Rodrigues Filho, M.G.; Antoniosi Filho, N.R.; Sinfrônio, F.S.M.; Rosenhaim, R.; Soledade, L.E.B.; Santos, I.M.G.; Souza, A.G. (2011) "Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel". *Fuel*, **90 (2)**, 773-778.
- Darnoko, D.; Cheryan, M. (2000) "Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77 (12)**, 1263-1267.
- De Jesus, A.; Silva, M.M.; Vale, M.G.R. (2008) "The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **74 (5)**, 1378-1384.
- De Jesus, A.; Zmozinski, A.V.; Barbará, J.A.; Vale, M.G.R.; Silva, M.M. (2010) "Determination of calcium and magnesium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry using microemulsions as sample preparation". *Energy & Fuels*, **24 (3)**, 2109-2112.
- De Oliveira, D.; Di Luccio, M.; Faccio, C.; Rosa, C.D. Bender, J.P.; Lipke, N.; Menoncin, S.; Amroginski, C.; de Oliveira, J.V. (2004) "Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **115 (1-3)**, 771-780.
- De Oliveira, A.P.; Villa, R.D.; Pinheiro Antunes, K.C.; de Magalhães, A.; Castro de Silva, E. (2009) "Determination of sodium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry using dry decomposition for the sample preparation". *Fuel*, **88 (4)**, 764-766.
- De Souza, R.M.; Leocadio, L.G.; da Silveira, C.L.P. (2008) "ICP OES simultaneous determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, and P in biodiesel by axial and radial inductively coupled plasma-optical emission spectrometry". *Analytical Letters*, **41 (9)**, 1615-1622.
- Demirbas, A. (2003) "Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: A survey". *Energy Conversion Management*, **44 (13)**, 2093-2109.
- Demirbas, A. (2007) "Importance of biodiesel as transportation fuel". *Energy Policy*, **35 (9)**, 4661-4670.
- Demirbas, A. (2008) "Relationships derived from physical properties of vegetable oil and biodiesel fuels". *Fuel*, **87 (8-9)**, 1743-1748.
- Demirbas, A. (2009) "Progress and recent trends in biodiesel fuels". *Energy Conversion and Management*, **50 (1)**, 14-34.
- Demirbas, A.; Demirbas, M.F. (2011) "Importance of algae oil as a source of biodiesel". *Energy Conversion and Management*, **52 (1)**, 163-170.
- Di Nicola, G.; Pacetti, M.; Polonara, F.; Santori, G.; Stryjek, R. (2008) "Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, **1190 (1-2)**, 120-126.
- Dias, J.M.; Alvim-Ferraz, M.C.M.; Almeida, M.F. (2008) "Comparison of the performance of different homogeneous alkali catalysts during transesterification of waste and virgin oils and evaluation of biodiesel quality". *Fuel*, **87 (17-18)**, 3572-3578.
- Díaz, L.; Borges, M.E.; Brito, A. (2010) "Catalizadores heterogéneos para la obtención de biodiésel. Estudio de la actividad de diferentes catalizadores en la reacción de transesterificación". *Ingeniería Química*, **489**, 50-54.
- Dinkov, R.; Hristov, G.; Stratiev, D.; Aldayri, V.B. (2009) "Effect of commercially available antioxidants over biodiesel/diesel blends stability". *Fuel*, **88 (4)**, 732-737.

- Dobarganes, M.C. (2009a) "Formation of new compounds during frying - General observations". The AOCS Lipid Library. Frying Oils: Chemistry, Analysis and Nutritional Aspects (<http://lipidlibrary.aocs.org/frying/c-newcpds/index.htm>).
- Dobarganes, M.C. (2009b) "Formation of Volatiles and Short-Chain Bound Compounds during the Frying Process". The AOCS Lipid Library. Frying Oils: Chemistry, Analysis and Nutritional Aspects (<http://lipidlibrary.aocs.org/frying/c-volatile/index.htm>).
- Domingos, A.K.; Saad, E.B.; Vechiatto, W.W.D.; Wilhelm, H.M.; Ramos, L.P. (2007) "The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel)". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **18** (2), 416-423.
- Dorado, M.P.; Ballesteros, E.; Almeida, J.A.; Schellet, C.; Lohrlein, H.P.; Krause, R. (2002) "An alkali-catalyzed transesterification process for high free fatty acid oils". *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*, **45** (3), 525529.
- Dorado, M.P.; Ballesteros, E.; Arnal, J.M.; Gómez, J.; López, F.J. (2003a) "Exhaust emissions from a diesel engine fueled with transesterified waste olive oil". *Fuel*, **82** (11), 1311-1315.
- Dorado, M.P.; Ballesteros, E.; Arnal, J.M.; Gómez, J.; López, F.J. (2003b) "Testing waste olive oil methyl ester as a fuel in a diesel engine". *Energy & Fuels*, **17** (6), 1560-1565.
- Dorado, M.P.; Ballesteros, E.; Mittelbach, M.; Lopez, F.J. (2004) "Kinetic parameters affecting the alkali-catalyzed transesterification process of used olive oil". *Energy & Fuels*, **18** (5), 1457-1462.
- Dos Santos, E.J.; Herrmann, A.B.; Chaves, E.S.; Vechiatto, W.W.D.; Schoemberger, A.C.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. (2007) "Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **22** (10), 1300-1303.
- Dos Santos, I.C.F.; de Carvalho, S.H.V.; Solleti, J.I.; Ferreira de La Salles, W.; Teixeira da Silva de La Salles, K.; Meneghetti, S.M.P. (2008) "Studies of *Terminalia catappa* L. oil: Characterization and biodiesel production". *Bioresource Technology*, **99** (14), 6545-6549.
- Dugo, P.; Kumm, T.; Chiofalo, B.; Cotroneo, A.; Mondello, L. (2006) "Separation of triacylglycerols in a complex lipidic matrix by using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection". *Journal of Separation Science*, **29** (8), 1146-1154.
- Dunn, R.O. (2002) "Effect of oxidation under accelerated conditions on fuel properties of methyl soyate (biodiesel)". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **79** (9), 915-920.
- Dunn, R.O. (2005a) "Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel)". *Fuel Processing Technology*, **86** (10), 1071- 1085.
- Dunn, R.O. (2005b) "Oxidative stability of soybean oil fatty acid methyl esters by oil stability index (OSI)". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **82** (5), 381-387.
- Dunn, R.O. (2008) "Antioxidants for improving storage stability of biodiesel". *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **2** (4), 304-318.
- Dunn, R.O. (2009) "Effects of minor constituents on cold flow properties and performance of biodiesel". *Progress in Energy and Combustion Science*, **35** (6), 481-489.
- Durbin, T.D.; Collins, J.R.; Norbeck, J.M.; Smith, M.R. (2000) "Effects of biodiesel, biodiesel blends, and a synthetic diesel on emissions from light heavy-duty diesel vehicles". *Environmental Science and Technology*, **34** (3), 349-355.
- EPI, Earth Policy Institute (www.earth-policy.org).
- EBB, European Biodiesel Board (<http://www.ebb-eu.org/biodiesel.php>).
- Edlund, M.; Visser, H.; Heitland, P. (2002) "Analysis of biodiesel by argon-oxygen mixed-gas inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **17**, 232-235.
- Eevera, T.; Rajendran, K.; Saradha, S. (2009) "Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions". *Renewable Energy*, **34** (3), 762-765.
- Eide, I.; Zahlsen, K. (2007) "Chemical fingerprinting of biodiesel using electrospray mass spectrometry and chemometrics: Characterization, discrimination, identification, and quantification in petrodiesel". *Energy & Fuels*, **21** (6), 3702-3708.
- Eldin, A.K. (2006) "Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108** (12), 1051-1061.
- El-Mashad, H.M.; Zhang, R.; Avena-Bustillos, R.J. (2008) "A two-step process for biodiesel production from salmon oil". *Biosystems Engineering*, **99** (2), 220-227.

- Encinar, J.M.; González, J.F.; Rodríguez-Reinares, A. (2005) "Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **44** (15), 5491-5499.
- Encinar, J.M.; González, J.F.; Rodríguez-Reinares, A. (2007) "Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization". *Fuel Processing Technology*, **88** (5), 513-522.
- Enweremadu, C.C.; Mbarawa, M.M. (2009) "Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13** (9), 2205-2224.
- EPA-420-P-02-001 (2002) "A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions".
- Escuderos, M.E.; Sayago, A.; Morales, M.T.; Aparicio, R. (2009) "Evaluación de α -tocoferol en aceite de oliva virgen mediante un método luminiscente". *Grasas y Aceites*, **60** (4), 336-342.
- Euroserver, Observatorio Europeo de Energías Renovables (<http://www.euroobserv-er.org/>).
- Fangrui, M.; Hanna, M.A.; (1999) "Biodiesel production: A review". *Bioresource Technology*. **70** (1), 1-15.
- Fasciotti, M.; Pereira Netto, A.D. (2010) "Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS". *Talanta*, **81** (3), 1116-1125.
- Fauconnot, L.; Hau, J.; Aeschlimann, J.M.; Fay, L.B.; Dionisi, F. (2004) "Quantitative analysis of triacylglycerol regioisomers in fats and oils using reversed-phase HPLC and APCI mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18** (2), 218-224.
- Felizardo, P.; Correia, M.J.N.; Raposo, I.; Mendes, J.F.; Berkemeier, R.; Bordado, J. (2006) "Production of biodiesel from waste frying oil". *Waste Management*, **26** (5), 487-494.
- Felizardo, P.; Baptista, P.; Menezes, J.C.; Correia, M.J.N. (2007) "Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel". *Analytica Chimica Acta*, **595** (1-2), 107-113.
- Ferella, F.; Mazziotti Di Celso, G.; De Michelis, I.; Stanisci, V.; Vegliò, F. (2010) "Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production". *Fuel*, **89** (1), 36-42.
- Fernández, C.M.; Ramos, M.J.; Pérez, A.; Rodríguez, J.F. (2010) "Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil". *Bioresource Technology*, **101** (18), 7019-7024.
- Fernando, S.; Karra, P.; Hernandez, R.; Jha, S.K. (2007) "Effect of incompletely converted soybean oil on biodiesel quality". *Energy*, **32** (5), 844-851.
- F.O. Licht World Bioethanol & Biofuels Reports (2011) "Biofuels and the international development agenda", Vol. 9 (9), 28 abril.
- Foglia, T.A.; Jones, K.C.; Phillips, J.G. (2005) "Determination of biodiesel and triacylglycerols in diesel fuel by LC". *Chromatographia*, **62** (3-4), 115-119.
- Fontaras, G.; Karavalakis, G.; Kousoulidou, M.; Tzamkiozis, T.; Ntziachristos, L.; Bakeas, E.; Stournas, S.; Samaras, Z. (2009) "Effects of biodiesel on passenger car fuel consumption, regulated and non-regulated pollutant emissions over legislated and real-world driving cycles". *Fuel*, **88** (9), 1608-1617.
- Frazier, R.A.; Ames, J.M.; Nursten, H.E. (1999) "The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis". *Electrophoresis*, **20** (15-16), 3156-3180.
- Freire, L.M.S.; Bicudo, T.C.; Rosenhaim, R.; Sinfrônio, F.S.M.; Botelho, J.R.; Carvalho Filho, J.R.; Santos, I.M.G.; Fernandes, V.J.; Antoniosi Filho, N.R.; Souza, A.G. (2009) "Thermal investigation of oil and biodiesel from *Jatropha curcas* L.". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **96** (3), 1029-1033.
- Fröhlich, A.; Rice, B. (2005) "Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production". *Industrial Crops and Products*, **21** (1), 25-31.
- Frondel, M.; Peters, J. (2007) "Biodiesel: A new oil dorado?". *Energy Policy*, **35** (3), 1675-1684.
- Fu, Y.J.; Zu, Y.G.; Wang, L.L.; Zhang, N.J.; Liu, W.; Li, S.M.; Zhang, S. (2008) "Determination of fatty acid methyl esters in biodiesel produced from yellow horn oil by LC". *Chromatographia*, **67** (1-2), 9-14.
- Fuchs, B.; Schiller, J. (2009a) "Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111** (1), 83-98.
- Fuchs, B.; Schiller, J. (2009b) "Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of apolar compounds". *Current Organic Chemistry*, **13** (16), 1664-1681.
- Fuchs, B.; Süß, R.; Schiller, J. (2010) "An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research". *Progress in Lipid Research*, **49**(4), 450-475.
- Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. (2001) "Biodiesel fuel production by transesterification of oils". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92** (5), 405-416.

- Gamazo-Vázquez, J.; García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J. (2003) "Control of contamination of olive oil by sunflower seed oil in bottling plants by GC-MS of fatty acid methyl esters". *Food Control*, **14** (7), 463-467.
- García Camacho, F.; Gallardo Rodríguez, J.J.; Sánchez Mirón, A.; Belarbi, E.H.; Chisti, Y.; Molina Grima, E. (2011) "Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga". *Process Biochemistry*, **46** (4), 936-944.
- García Camús, J.M.; García Laborda, J.A. (2007) "Biocarburantes líquidos: Biodiesel y bioetanol". Informe de Vigilancia Tecnológica. Universidad Rey Juan Carlos. Círculo de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME). Depósito Legal: M-30985-2006.
- García-Perez, M.; Adams, T.T.; Goodrum, J.W.; Das, K.C.; Geller, D.P. (2010) "DSC studies to evaluate the impact of bio-oil on cold flow properties and oxidation stability of bio-diesel". *Bioresource Technology*, **101** (15), 6219-6224.
- Georgogianni, K.G.; Kontominas, M.G.; Tegou, E.; Avlonitis, D.; Gergis, V. (2007) "Biodiesel production: Reaction and process parameters of alkali-catalysed transesterification of waste frying-oils". *Energy & Fuels*, **21** (5), 3023-3027.
- Georgogianni, K.G.; Kontominas, A.G.; Pomonis, P.J.; Avlonitis, D.; Gergis, V. (2008) "Alkaline conventional and in situ transesterification of cottonseed oil for the production of biodiesel". *Energy & Fuels*, **22** (3), 2110-2115.
- Ghadge, S.V.; Raheman, H. (2005) "Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids". *Biomass and Bioenergy*, **28** (6), 601-605.
- Ghadge, S.V.; Raheman, H. (2006) "Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology". *Bioresource Technology*, **97** (3), 379-384.
- Ghisi, M.; Chaves, E.S.; Quadros, D.P.C.; Marques, E.P.; Curtius, A.J.; Marques, A.L.B. (2011) "Simple method for the determination of Cu and Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide". *Microchemical Journal*, **98** (1), 62-65.
- Gidden, J.; Liyanage, R.; Durham, B.; Lay, J.O. (2007) "Reducing fragmentation observed in the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of triacylglycerols in vegetable oils". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21** (13), 1951-1957.
- Girard, P.; Fallot, A. (2006) "Review of existing and emerging technologies for the production of biofuels in developing countries". *Energy for Sustainable Development*, **10** (2), 92-108.
- Gominho, J.; Lourenço, A.; Palma, P.; Lourenço, M.E.; Curt, M.D.; Fernández, J.; Pereira, H. (2011) "Large scale cultivation of *Cynara cardunculus* L. for biomass production - A case study". *Industrial Crops and Products*, **33** (1), 1-6.
- González, A.; Armenta, S.; de la Guardia, M. (2010) "Adulteration detection of argan oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Food Chemistry*, **121** (3), 878-886.
- Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Bianchib, G.; Kella, D.B. (2002) "Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils". *Analyst*, **127** (11), 1457-1462.
- Goodrum, J.W.; Geller, D.P.; Adams, T.T. (2003) "Rheological characterization of animal fats and their mixtures with #2 fuel oil". *Biomass and Bioenergy*, **24** (3), 249-256.
- Goodrum, J.W.; Geller, D.P. (2005) "Influence of fatty acid methyl esters from hydroxylated vegetable oils on diesel fuel lubricity". *Bioresource Technology*, **96** (7), 851-855.
- Gopinath, A.; Puhan, S.; Nagarajan, G. (2009) "Theoretical modeling of iodine value and saponification value of biodiesel fuels from their fatty acid composition". *Renewable Energy*, **34** (7), 1806-1811.
- Gordon, M.E.; Mursi, E. (2004) "A comparison of oil stability based on the Metrohm Rancimat with storage at 20 °C". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **71** (6), 649-651.
- Grau, B.; Bernat, E.; Rius A.; Riba, J.R.; Puig, R. (2010) "Small-scale production of straight vegetable oil from rapeseed and its use as biofuel in the Spanish territory". *Energy Policy*, **38** (1), 189-196.
- Guan, G.; Sakurai, N.; Kusakabe, K.; (2009) "Synthesis of biodiesel from sunflower oil at room temperature in the presence of various cosolvents". *Chemical Engineering Journal*, **146** (2), Pages 302-306.
- Gui, M.M.; Lee, K.T.; Bhatia S. (2008) "Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock". *Energy*, **33** (11), 1646-1653.
- Gumus, M.; Kasifoglu, S. (2010) "Performance and emission evaluation of a compression ignition engine using a biodiesel (apricot seed kernel oil methyl ester) and its blends with diesel fuel". *Biomass and Bioenergy*, **34** (1), 134-139.
- Guncheva, M.; Zhiryakova, D. (2011) "Catalytic properties and potential applications of *Bacillus lipases*". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68** (1), 1-21.

- Gurdeniz, G.; Tokatli, F.; Ozen, B. (2007) "Differentiation of mixtures of monovarietal olive oils by mid-infrared spectroscopy and chemometrics". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109** (12), 1194-1202.
- Gurdeniz, G.; Ozen, B. (2009) "Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data". *Food Chemistry*, **116** (2), 519-525.
- Guyon, F.; Absalon, C.; Salagoity, M.H.; Esclapez, M.; Medina, B. (2003) "Comparative study of matrix-assisted laser desorption/ionization and gas chromatography for quantitative determination of cocoa butter and cocoa butter equivalent triacylglycerol composition". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17** (20), 2317-2322.
- Haas, M.J. (2005) "Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: Vegetable oil soapstock". *Fuel Processing Technology*, **86** (10), 1087-1096.
- Haas, M.J.; McAloon, A.J.; Yee, W.C.; Foglia, T.A. (2006) "A process model to estimate biodiesel production costs". *Bioresource Technology*, **97** (4), 671-678.
- Haddad, R.; Milagre, H.M.S.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N. (2008) "Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography". *Analytical Chemistry*, **80** (8), 2744-2750.
- Halim, S.F.A.; Kamaruddin, A.H.; Fernando, W.J.N. (2009) "Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies". *Bioresource Technology*, **100** (2), 710-716.
- Harynuk, J.; Wynne, P.M.; Marriott, P.J. (2006) "Evaluation of new stationary phases for the separation of fatty acid methyl esters". *Chromatographia*, **63** (13), S61-S66.
- Hejazi, L.; Ebrahimi, D.; Guilhaus, M.; Hibbert, D.B. (2009) "Discrimination among geometrical isomers of α -linolenic acid methyl ester using low energy electron ionization mass spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **20** (7), 1272-1280.
- Helwani, Z.; Othman, M.R.; Aziz, N.; Kim, J.; Fernando, W.J.N. (2009) "Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: A review". *Applied Catalysis A: General*, **363** (1-2), 1-10.
- Hess, M.A.; Hass, M.J.; Thomas, A.F.; Marmer, W.N. (2005) "Effect of antioxidant addition on NO_x emissions from biodiesel". *Energy & Fuels*, **19** (4), 1749-1754.
- Hincapié, G.; Mondragón, F.; López, D. (2011) "Conventional and in situ transesterification of castor seed oil for biodiesel production". *Fuel*, **90** (4), 1618-1623.
- Hingu, S.M.; Gogate, P.R.; Rathod, V.K. (2010) "Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors". *Ultrasonics Sonochemistry*, **17** (5), 827-832.
- Holčapek, M.; Jandera, P.; Fischer, J. (2001) "Analysis of acylglycerols and methyl esters of fatty acids in vegetable oils and in biodiesel". *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **31** (1), 53-56.
- Holčapek, M.; Jandera, P.; Zderadička, P.; Hrubá, L. (2003) "Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, **1010** (2), 195-215.
- Holser, R.A.; O'Kuru, R.H. (2006) "Transesterified milkweed (*Asclepias*) seed oil as a biodiesel fuel". *Fuel*, **85** (14-15), 2106-2110.
- Houška, J.; Panyala, N.R.; Peña-Méndez, E. M.; Havel, J. (2009) "Mass spectrometry of nanodiamonds". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **23** (8), 1125-1131.
- Ikwuagwu, O.E.; Ononogbu, I.C.; Njoku, O.U. (2000) "Production of biodiesel using rubber [*Hevea brasiliensis* (Kunth. Muell.) seed oil". *Industrial Crops and Products*, **12** (1), 57-62.
- Infinitas Renovables. Informe Sectorial sobre el sector de los biocombustibles durante el año 2010. (<http://www.infinitarenovables.es/noticia.php?id=67>).
- Innawong, B.; Mallikarjunan, P.; Irudayaraj, J.; Marcy, J.E. (2004) "The determination of frying oil quality using Fourier transform infrared attenuated total reflectance". *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **37** (1), 23-28.
- Iqbal, J.; Carney, W.A.; LaCaze, S.; Theegala, C.S. (2010) "Metals determination in biodiesel (B100) by ICP-OES with microwave assisted acid digestion". *The Open Analytical Chemistry Journal*, **4**, 18-26.
- ISO 3405:2011. International Standard. Petroleum products - Determination of distillation characteristics at atmospheric pressure.
- ISO 3987:1994. International Standard. Petroleum products - Lubricating oils and additives. Determination of sulfated ash.

- Issariyakul, T.; Kulkarni, M.G.; Dalai, A.K.; Bakhshi, N.N. (2007) "Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system". *Fuel Processing Technology*, **88** (5), 429-436.
- Issariyakul, T.; Kulkarni, M.G.; Meher, L.C.; Dalai, A.K.; Bakhshi, N.N. (2008) "Biodiesel production from mixtures of canola oil and used cooking oil". *Chemical Engineering Journal*, **140** (1-3), 77-85.
- Isis Innovation (2008) "Biomass to Methanol Process". Project Number 3680. Oxford University. (<http://www.isis-innovation.com/licensing/3680.html>).
- Izquierdo Herrera, I.A. (2006) "Caracterización del biodiesel obtenido a partir de aceites de fritura. Estabilidad del biocombustible". Proyecto Fin de Carrera. Universidad de La Laguna, Tenerife, España.
- Jain, S.; Sharma, M.P. (2010) "Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14** (7), 1937-1947.
- Jakab, A.; Heberger, K.; Forgács, E. (2002) "Comparative analysis of different plant oils by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, **976** (1-2), 255-263.
- Janaun, J.; Ellis N. (2010) "Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14** (4), 1312-1320.
- Jeong, G.T.; Yang, H.S.; Park, D.H. (2009) "Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology". *Bioresource Technology*, **100** (1), 25-30.
- Jiménez, A.M.; Hermoso, M.; Uceda, M. (1995) "Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema continuo de dos fases". *Grasas y Aceites*, **46** (4-5), 299-303.
- Jiménez, M.S.; Velarte, R.; Castillo, J.R. (2003) "On-line emulsion of olive samples and ICP-MS multi-elemental determination". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18**, 1154-1162.
- Jin, F.; Kawasaki, K.; Kishida, H.; Tohji, K.; Moriya, T.; Enomoto H. (2007) "NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil". *Fuel*, **86** (7-8), 1201-1207.
- Joshi, H.; Toler, J.; Moser, B.R.; Walker, T. (2009) "Biodiesel from canola oil using a 1:1 molar mixture of methanol and ethanol". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111** (5), 464-473.
- Joshua, T. (2000) "From the fryer to the fuel tank. The complete guide to using vegetable oil as an alternative fuel". Tickell Energy Consulting. United States of America.
- Kafuku, G.; Lam, M.K.; Kasedo, J.; Teong Lee, K.; Mbarawa, M. (2010) "*Croton megalocarpus* oil: A feasible non-edible oil source for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **101** (18), 7000-7004.
- Kalligeros, S.; Zannikos, F.; Stournas, S.; Lois, E.; Anastopoulos, G.; Teas, C.; Sakellaropoulos, F. (2003) "An investigation of using biodiesel/marine diesel blends on the performance of a stationary diesel engine". *Biomass and Bioenergy*, **24** (2), 141-149.
- Kasim, N.S.; Tsai, T.H.; Gunawan, S.; Ju Y.H. (2009) "Biodiesel production from rice bran oil and supercritical methanol". *Bioresource Technology*, **100** (8), 2399-2403.
- Karaosmanoğlu, F.; Akdag, A.; Cigizoglu, K.B. (1996) "Biodiesel from rapeseed oil of turkish origin as an alternative fuel". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **61** (3), 251-265.
- Karavalakis, G.; Hilari, D.; Givalou, L.; Karonis, D.; Stournas, S. (2011) "Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants". *Energy*, **36** (1), 369-374.
- Karmakar, A.; Karmakar, S.; Mukherjee, S. (2010) "Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **101** (19), 7201-7210.
- Kaya, C.; Hamamci, C.; Baysal, A.; Akba, O.; Erdogan, S.; Saydut, A. (2009) "Methyl ester of peanut (*Arachis hypogea* L.) seed oil as a potential feedstock for biodiesel production". *Renewable Energy*, **34** (5), 1257-1260.
- Kawashima, A.; Matsubara, K.; Honda, K. (2008) "Development of heterogeneous base catalysts for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **99** (9), 3439-3443.
- Kee Lam, M.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. (2010) "Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review". *Biotechnology Advances*, **28** (4), 500-518.
- Keera, S.T.; El Sabagh, S.M.; Taman; A.R. (2011) "Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst". *Fuel*, **90** (1), 42-47.
- Kheang, L.S.; Foon, C.S.; May, C.Y.; Ngan, M.A. (2006) "A study of residual oils recovered from spent bleaching earth: Their characteristics and applications". *American Journal of Applied Sciences*, **3** (10), 2063-2067.
- Kim, H.J.; Kang, B.S.; Kim, M.J.; Park, Y.M.; Kim, D.K.; Lee, J.S.; Lee, K.Y. (2004) "Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst". *Catalysis Today*, **93-95**, 315-320.

- Kyriakidis, N.B.; Katsiloulis, T. (2000) "Calculation of iodine value from measurements of fatty acid methyl esters of some oils: Comparison with the relevant American Oil Chemists' Society method". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77 (12)**, 1235-1238.
- Kiritsakis, A.K. (1998) "Olive oil from the tree to the table". 2nd Edition. Food and Nutrition Press Inc., Trumbull, CT, USA. ISBN: 0917678427.
- Kiritsakis, A.; Kanavouras, A.; Kiritsakis, K. (2002) "Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104 (9-10)**, 628-638.
- Kivevele, T.T.; Mbarawa, M.M.; Bereczky, A.; Laza, T.; Madarasz, H. (2011) "Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of biodiesel produced from *Croton megalocarpus* oil". *Fuel Processing Technology*, **92 (6)**, 1244-1248.
- Klofutar, B.; Golob, J.; Likozar, B.; Klofutar, C.; Žagar, E.; Poljanšek, I. (2010) "The transesterification of rapeseed and waste sunflower oils: Mass-transfer and kinetics in a laboratory batch reactor and in an industrial-scale reactor/separator setup". *Bioresource Technology*, **101 (10)**, 3333-3344.
- Knothe, G. (1999) "Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by NIR spectroscopy using a fiber-optic probe". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76 (7)**, 795-800.
- Knothe, G. (2001a) "Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber optic near-infrared spectroscopy and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78 (10)**, 1025-1028.
- Knothe, G. (2001b) "Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel". *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **44 (2)**, 193-200.
- Knothe, G.; Krahl, J.; Van Gerpen, J. (2005) "The biodiesel handbook". Second Edition. USA: AOCS Press. ISBN: 978-1-4398-2235-7.
- Knothe, G.; Christopher, A.S.; Ryan, T.W. (2006) "Exhaust emissions of biodiesel, petrodiesel neat methyl esters and alkanes in a new technology engine". *Energy & Fuels*, **20 (1)**, 403-408.
- Knothe, G. (2007) "Some aspects of biodiesel oxidative stability". *Fuel Processing Technology*, **88 (7)**, 669-677.
- Knothe, G.; Steidley, K.R. (2009) "A comparison of used cooking oils: A very heterogeneous feedstock for biodiesel". *Bioresource Technology*, **100 (23)**, 5796-5801.
- Knothe, G. (2010) "Biodiesel and renewable diesel: A comparison". *Progress in Energy and Combustion Science*, **36 (3)**, 364-373.
- Koh, L.P.; Ghazoul, J. (2008) "Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities". *Biological Conservation*, **141 (10)**, 2450-2460.
- Koning, S.; Meer, B.V.D.; Alkema, G.; Janssen, H.G.; Brinkman, U.A.T. (2001) "Automated determination of fatty acid methyl ester and cis/trans methyl ester composition of fats and oils". *Journal of Chromatography A*, **922 (1-2)**, 391-397.
- Korn, M.G.A.; dos Santos, D.S.S.; Welz, B.; Vale, M.G.R.; Teixeira, A.P.; Lima, D.C.; Ferreira, S.L.C. (2007) "Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels: A review". *Talanta*, **73 (1)**, 1-11.
- Korn, M.G.A.; Santos, D.C.M.B.; Guida, M.A.B.; Barbosa, I.S.; Passos, M.L.C.; Saraiva, M.L.M.F.S.; Lima, J.L.F.C. (2010) "Evaluation of digestion procedures for simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **21 (12)**, 2278-2284.
- Krohn, B.J.; McNeff, C.V.; Yan, B.; Nowlan, D. (2011) "Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcyan® process". *Bioresource Technology*, **102 (1)**, 94-100.
- Kumar, D.; Kumar, G.; Poonam, S.; Singh, C.P. (2010a) "Fast, easy ethanolysis of coconut oil for biodiesel production assisted by ultrasonication". *Ultrasonics Sonochemistry*, **17 (3)**, 555-559.
- Kumar, D.; Kumar, G.; Poonam, S.; Singh, C.P. (2010b) "Ultrasonic-assisted transesterification of *Jatropha curcus* oil using solid catalyst, Na/SiO₂". *Ultrasonics Sonochemistry*, **17 (5)**, 839-844.
- Kumar, R.; Kumar, G.R.; Chandrashekar, N. (2011) "Microwave assisted alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* seed oil for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **102 (11)**, 6617-6620.
- Kusdiana, D.; Saka, S. (2004) "Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment". *Bioresource Technology*, **91 (3)**, 289-295.
- Labeckas, G.; Slavinskas, S. (2006) "The effect of rapeseed oil methyl ester on direct injection diesel engine performance and exhaust emissions". *Energy Conversion and Management*, **47 (13-14)**, 1954-1967.

- Landa, I. (2006) "Caracterización de biodiesel. Principales parámetros de calidad". Congreso Bio Oil-2006. Centro Multidisciplinar de Innovación y Tecnología de Navarra de Fundación Cetena (CEMITEC).
- Lam, M.K.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. (2010) "Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review". *Biotechnology Advances*, **28** (4), 500-518.
- Lapuerta, M.; Armas, O.; Ballesteros, R. (2002) "Diesel particulate emissions from biofuels derived from Spanish vegetable oils". *Society of Automotive Engineers*, paper 2002-01-1657.
- Lapuerta, M.; Armas, O.; Ballesteros, R.; Fernández, J. (2005) "Diesel emissions from biofuels derived from Spanish potential vegetable oils". *Fuel*, **84** (6), 773-780.
- Lapuerta, M.; Herreros, J.M.; Lyons, L.L.; Contreras, R.G.; Briceño, Y. (2008) "Effect of the alcohol type used in the production of waste cooking oil biodiesel on diesel performance and emissions". *Fuel*, **87** (15-16), 3161-3169.
- Lapuerta, M.; Rodríguez-Fernández, J.; Font de Mora, E. (2009) "Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number". *Energy Policy*, **37** (11), 4337-4344.
- Lay, J.O.; Liyanage, R.; Durham, B.; Brooks, J. (2006) "Rapid characterization of edible oils by direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis using triacylglycerols". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20** (6), 952-958.
- Lendinez, E. (2004) "Influencia del proceso de obtención sobre la presencia de metales en el aceite de oliva virgen y su relación con la calidad sensorial". Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Lerma-García, M.J.; Herrero-Martínez, J.M.; Ramis-Ramos, G.; Simó Alfonso, E.F. (2008) "Evaluation of the quality of olive oil using fatty acid profiles by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry". *Food Chemistry*, **107** (3), 1307-1313.
- Lertsathapornasuk, V.; Pairintra, R.; Aryasuk, K.; Krisnangkur, K. (2008) "Microwave assisted biodiesel production from waste frying palm oil and its performance in a 100 kW diesel generator". *Fuel Processing Technology*, **89** (12), 1330-1336.
- Leung, D.Y.C.; Guo, Y. (2006a) "Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production". *Fuel Processing Technology*, **87** (10), 883-890.
- Leung, D.Y.C.; Luo, Y.; Chan, T.L. (2006b) "Optimization of exhaust emissions of a diesel engine fuelled with biodiesel". *Energy & Fuels*, **20** (3), 1015-1023.
- Leung, D.Y.C.; Wu, X.; Leung, M.K.H. (2010) "A review on biodiesel production using catalyzed transesterification". *Applied Energy*, **87** (4), 1083-1095.
- Lianhua, L.; Pengmei, L.; Wen, L.; Zhongming, W.; Zhenhong, Y. (2010) "Esterification of high FFA tung oil with solid acid catalyst in fixed bed reactor". *Biomass and Bioenergy*, **34** (4), 496-499.
- Li, S.; Wang, Y.; Dong, S.; Chen, Y.; Cao, F.; Chai, F.; Wang, X. (2009) "Biodiesel production from *Eruca sativa* gars vegetable oil and motor emissions properties". *Renewable Energy*, **34** (7), 1871-1876.
- Li, Y.; Zhang, X.D.; Sun, L. (2010) "Fatty acid methyl esters from soapstocks with potential use as biodiesel". *Energy Conversion and Management*, **51** (11), 2307-2311.
- Liang, Y.C.; May, C.Y.; Foon, C.S.; Ngan, M.A.; Hock, C.C.; Basiron, Y. (2006) "The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel". *Fuel*, **85** (5-6), 867-870.
- Lim, S.; Teong, L.K. (2010) "Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14** (3), 938-954.
- Lin, B.F.; Huang, J.H.; Huang, D.Y. (2009) "Experimental study of the effects of vegetable oil methyl ester on DI diesel engine performance characteristics and pollutant emissions". *Fuel*, **88** (9), 1779-1785.
- Lin, C.Y.; Chiu, C.C. (2010) "Burning characteristics of palm-oil biodiesel under long-term storage conditions". *Energy Conversion and Management*, **51** (7), 1464-1467.
- Lisa, M.; Holčápek, M.; Boháč, M. (2009) "Statistical evaluation of triacylglycerol composition in plant oils based on high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry data". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (15), 6888-6898.
- List, G.R.; Byrdwell, W.C.; Steidley, K.R.; Adlof, R.O.; Neff, W.E. (2005) "Triacylglycerol structure and composition of hydrogenated soybean oil margarine and shortening basestocks". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (12), 4692-4695.
- Liu, K.K.M.; Barrows, F.T.; Hardy, R.W.; Dong, F.M. (2004) "Body composition, growth performance, and product quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing poultry fat, soybean/corn lecithin, or menhaden oil". *Aquaculture*, **238** (1-4), 309-328.

- Liu, X.; He, H.; Wang, Y.; Zhu, S.; Piao, X. (2008) "Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst". *Fuel*, **87** (2), 216-221.
- Liu, S.; McDonald, T.; Wang, Y. (2010) "Producing biodiesel from high free fatty acids waste cooking oil assisted by radio frequency heating". *Fuel*, **89** (10), 2735-2740.
- Llorent-Martínez, E.J.; Ortega-Barrales, P.; Fernández-de Córdova, M.L.; Domínguez-Vidal, A.; Ruiz-Medina, A. (2011) "Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain". *Food Chemistry*, **127** (3), 1257-1262.
- Lobo, F.A.; Goveia, D.; de Oliveira, A.P.; Pereira-Filho, E.R.; Fraceto, L.F.; Dias Filho, N.L.; Rosa, A.H. (2009) "Comparison of the univariate and multivariate methods in the optimization of experimental conditions for determining Cu, Pb, Ni and Cd in biodiesel by GFAAS". *Fuel*, **88** (10), 1907-1914.
- Lobo, F.A.; Goveia, D.; de Oliveira, A.P.; Romão, L.P.C.; Fraceto, L.F.; Dias Filho, N.L.; Rosa, A.H. (2011) "Development of a method to determine Ni and Cd in biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Fuel*, **90** (1), 142-146.
- López Díaz, M.A. (2005) "El biodiesel una alternativa al transporte". 1ª edición. España: Ediciones MADU S.A. ISBN: 9788495998484.
- Lowe, G.A.; Peterson, C.L.; Thompson, J.C.; Taberski, J.S.; Mann, P.T.; Chase, C.L. (1998) "Producing HySEE biodiesel from used french fry-oil and ethanol for an over-the-road truck". Presented at the 1998 American Society of Agricultural Engineers Annual International Meeting, Paper Nº 98-6081, St. Joseph, MO. EE.UU.
- Lu, H.; Liu, Y.; Zhou, H.; Yang, Y.; Chen, M.; Liang, B. (2009) "Production of biodiesel from *Jatropha curcas L.* oil". *Computers & Chemical Engineering Chemical Products: From conceptualization to commercialization*, **33** (5), 1091-1096.
- Luo, Y.; Wang, G.; Ma, Y.; Wei, D. (2006) "Application of a silica gel prolonged-release system for methanol in the production of biodiesel". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81** (11), 1846-1848.
- Lyra, F.H.; Carneiro, M.T.W.D.; Brandão, G.P.; Pessoa, H.M.; Castro, E.V. (2010) "Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (F AAS) using microemulsion as sample preparation". *Microchemical Journal*, **96** (1), 180-185.
- Ma, F.; Hanna, M.A. (1999) "Biodiesel production: A review". *Bioresource Technology*, **70** (1), 1-15.
- Marchetti, J.M.; Miguel, V.U.; Errazu, A.F. (2007) "Possible methods for biodiesel production". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **11** (6), 1300-1311.
- Marchetti, J.M.; Errazu, A.F. (2008) "Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides". *Biomass and Bioenergy*, **32** (9), 892-895.
- Marimuthu, C.; Srinivasan, S.; Periyasamy, K.; Ganesan, B.; Manickam, J.; Gnanasekaran, V.; Veeramalai, K. (2010) "Study of diacyl glycerides profile and content in cooking oils using thin layer chromatography and gel permeation chromatography". *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **6** (1), 35-44.
- Marmesat, S.; Rodríguez-Macado, E.; Velasco, J.; Dorbangarnes, M.C. (2007) "Used frying fats and oils: Comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties". *International Journal of Food Science & Technology*, **42** (5), 601-608.
- Martín, C.; Moure, A.; Martín, G.; Carrillo, E.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2010) "Fractional characterisation of jatropha, neem, moringa, trisperma, castor and candlenut seeds as potential feedstocks for biodiesel production in Cuba". *Biomass and Bioenergy*, **34** (4), 533-538.
- Martín Andara, D.L. (2008) "Purificación y caracterización del biodiesel obtenido a partir de aceites de fritura. Estabilidad del biocombustible". Proyecto Fin de Carrera. Universidad de La Laguna, Tenerife, España.
- Martín Gómez, M.A.; Ballesteros González, M. (2010) "Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores", Monografía XXX: Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica. Real Academia Nacional de Farmacia. Ministerio de Educación, Política Social y Deporte de España.
- Martín-Lagos Martínez, J.A. (2007) "Estudio de los índices de calidad en aceites de oliva de la provincia de Granada". Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Marulanda, V.F.; Anitescu, G.; Tavlarides, L.L. (2010) "Investigations on supercritical transesterification of chicken fat for biodiesel production from low-cost lipid feedstocks". *The Journal of Supercritical Fluids*, **54** (1), 53-60.
- Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. (2010) "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14** (1), 217-232.
- Math, M.C.; Kumar, S.P.; Chetty, S.V. (2010) "Technologies for biodiesel production from used cooking oil - A review". *Energy for Sustainable Development*, **14** (4), 339-345.

- Matos Reyes, M.N.; Campos, R.C. (2005) "Graphite furnace absorption spectrometric determination of Ni and Pb in diesel and gasoline samples stabilized as microemulsion using conventional and permanent modifiers". *Spectrochimica Acta Part B*, **60 (30)**, 615-624.
- Matos Reyes, M.N.; Campos, R.C. (2006) "Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **70 (5)**, 929-932.
- McCormick, R.L.; Ratcliff, M.; Moens, L.; Lawrence, R. (2007) "Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests". *Fuel Processing Technology*, **88 (7)**, 651-657.
- McCormick, R.L.; Álvarez, J.R.; Graboski, M. (2003) "NO_x solutions for biodiesel". Colorado Institute for Fuels and Engine Research. National Renewable Energy Laboratory. Department of Energy U.S. NREL/SR-510-31465.
- Meher, L.C.; Dharmagadda, V.S.S.; Naik, S.N. (2006a) "Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel". *Bioresource Technology*, **97 (12)**, 1392-1397.
- Meher, L.C.; Dharmagadda, V.S.S.; Naik, S.N. (2006b) "Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **10 (3)**, 248-268.
- Meira, M.; Quintella, C.M.; dos Santos Tanajura, A.; Gonçalves da Silva, H.R.; Santos Fernando, J.D.; da Costa Neto, P.R.; Pepe, I.M.; Andrade Santos, M.; Lordelo Nascimento, L. (2011) "Determination of the oxidation stability of biodiesel and oils by spectrofluorimetry and multivariate calibration". *Talanta*, **85 (1)**, 430-434.
- Melero, J.A.; Calleja, G.; Garcia, A.; Clavero, M.; Hernandez, E.A.; Miravalles, R.; Galindo, T. (2010) "Storage stability and corrosion studies of renewable raw materials and petrol mixtures: A key issue for their co-processing in refinery units". *Fuel*, **89 (3)**, 554-562.
- Melvin Jose, D.F.; Raj, R.E.; Prasad, B.D.; Kennedy, Z.R.; Ibrahim, A.M. (2011) "A multi-variant approach to optimize process parameters for biodiesel extraction from rubber seed oil". *Applied Energy*, **88 (6)**, 2056-2063.
- Mendil, D.; Uluözlü, O.D.; Tüzen, M.; Soylak, M. (2009) "Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry". *Journal of Hazardous Materials*, **165 (1-3)**, 724-728.
- Meng, X.; Chen, G.; Wang, Y. (2008) "Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test". *Fuel Processing Technology*, **89 (9)**, 851-857.
- Miao, X.; Wu, Q. (2006) "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil". *Bioresource Technology*, **97 (6)**, 841-846.
- Miller, J.N.; Miller, J.C. (2002) "Estadística y Quimiometría para Química Analítica", 4ª edición, Prentice Hall. ISBN: 9788420535142.
- Mittelbach, M. (1996) "Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel". *Bioresource Technology*, **56 (1)**, 7-11.
- Mittelbach, M.; Enzelsberger, H. (1999) "Transesterification of heated rapeseed oil for extending diesel fuel". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76 (5)**, 545-550.
- Mittelbach, M.; Gangl, S. (2001) "Long storage stability of biodiesel made from rapeseed and used frying oil". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78 (6)**, 573-577.
- Mittelbach, M.; Schober, S. (2003) "The influence of antioxidants on the oxidation stability of biodiesel". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80 (8)**, 817-823.
- Mittelbach, M.; Renschmidt, C. (2004) "Biodiesel - The comprehensive handbook". Ed: M. Mittelbach. Karl-Franzens University, Graz, Austria.
- Molina Grima, E.; Ación Fernández, F.G.; García Camacho, F.; Chisti, Y. (1999) "Photobioreactors: Light regime, mass transfer, and scaleup". *Journal of Biotechnology*, **70 (1-3)**, 231-247.
- Molina Grima, E.; Fernández, J.; Ación Fernández, F.G.; Chisti, Y. (2001) "Tubular photobioreactor design for algal cultures". *Journal of Biotechnology*, **92 (2)**, 113-131.
- Molina Grima, E.; Belarbi, E.H.; Ación Fernández, F.G.; Robles Medina, A.; Chisti Y. (2003) "Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics". *Biotechnology Advances*, **20 (7-8)**, 491-515.
- Mondala, A.; Liang, K.; Toghiani, H.; Hernandez, R.; French, T. (2009) "Biodiesel production by in situ transesterification of municipal primary and secondary sludges". *Bioresource Technology*, **100 (3)**, 1203-1210.
- Mondello, L.; Tranchida, P.Q.; Stanek, V.; Jandera, P.; Dugo, G.; Dugo, P. (2005) "Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis". *Journal of Chromatography A*, **1086 (1-2)**, 91-98.

- Monteiro, M.R.; Ambrozin, A.R.P.; Lião, L.M.; Ferreira, A.G. (2008) "Critical review on analytical methods for biodiesel characterization". *Talanta*, **77** (2), 593-605.
- Monteiro, M.R.; Ambrozin, A.R.P.; Lião, L.M.; Ferreira, A.G. (2009) "Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ¹H NMR". *Fuel*, **88** (4), 691-696.
- Montgomery, D.C.; Runger, G.C. (2007) "Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería". 2ª edición, Limusa Wiley, Méjico.
- Monti, S.M.; Ritieni, A.; Sacchi, R.; Skog, K.; Borgen, E.; Fogliano, V.J. (2001) "Characterization of phenolic-compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (8), 3969-3975.
- Monyem, A.; Van Gerpen, J.H. (2001) "The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions". *Biomass and Bioenergy*, **20** (4), 317-325.
- Moser, B.R. (2009) "Biodiesel production, properties, and feedstocks". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **45** (3), 229-266.
- Moser, B.R.; Vaughn, S.F. (2010) "Evaluation of alkyl esters from *Camelina sativa* oil as biodiesel and as blend components in ultra low-sulfur diesel fuel". *Bioresource Technology*, **101** (2), 646-653.
- Mukta, N.; Sreevalli, Y. (2010) "Propagation techniques, evaluation and improvement of the biodiesel plant, *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. A review". *Industrial Crops and Products*, **31** (1), 1-12.
- Murugesan, A.; Umarani, C.; Chinnusamy, T.R.; Krishnan, M.; Subramanian, R.; Neduzchezhain N.; (2009) "Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils - A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13** (4), 825-834.
- Musa Özcan, M. (2006) "Determination of the mineral compositions of some selected oil-bearing seeds and kernels using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES)". *Grasas y Aceites*, **57** (2), 211-218.
- Nabi, N.M.; Hoque, S.M.N.; Akhter, S. (2009) "Karanja (*Pongamia pinnata*) biodiesel production in Bangladesh, characterization of karanja biodiesel and its effect on diesel emissions". *Fuel Processing Technology*, **90** (9), 1080-1086.
- Nagy, K.; Bongiorno, D.; Avellone, G.; Agozzino, P.; Ceraulo, L.; Vekey, K. (2005) "High performance liquid chromatography-mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils". *Journal of Chromatography A*, **1078** (1-2), 90-97.
- Naik, M.; Meher, L.C.; Naik, S.N.; Das, L.M. (2008) "Production of biodiesel from high free fatty acid Karanja (*Pongamia pinnata*) oil". *Biomass and Bioenergy*, **32** (4), 354-357.
- Nakpong, P.; Wootthikanokkhan, S. (2010) "Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) oil as an alternative feedstock for biodiesel production in Thailand". *Fuel*, **89** (8), 1806-1811.
- Narayan, C.M. (2002) "Vegetable oil as engine fuels - Prospect and retrospect". *Proceedings on Recent Trends in Automotive Fuels, Nagpur, India*. 22-26.
- Nebel, B.A.; Mittelbach, M. (2006) "Biodiesel from extracted fat out of meat and bone meal". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108** (5), 398-403.
- Ngamcharussrivichai, C.; Totarat, P.; Bunyakiat, K. (2008) "Ca and Zn mixed oxide as a heterogeneous base catalyst for transesterification of palm kernel oil". *Applied Catalysis A: General*, **341** (1-2), 77-85.
- Nouredini, H.; Zhu, D. (1997) "Kinetics of transesterification of soybean oil". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74** (11), 1457-1463.
- Nunes, L.S.; Barbosa, J.T.P.; Fernandes, A.P.; Lemos, V.A.; dos Santos, W.N.L.; Korn, M.G.A.; Teixeira, L.S.G. (2011) "Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation". *Food Chemistry*, **127** (2), 780-783.
- Onyeike, E.N.; Acheru, G.N. (2002) "Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts". *Food Chemistry*, **77** (4), 431-437.
- Oliveira, J.S.; Montalvão, R.; Daher, L.; Suarez, P.A.Z.; Rubim, J.C. (2006a) "Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies". *Talanta*, **69** (5), 1278-1284.
- Oliveira, A.C.; Rosa, M.F. (2006b) "Enzymatic transesterification of sunflower oil in an aqueous-oil biphasic system". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **83** (1), 21-25.
- Oliveira, L.S.; Franca, A.S.; Camargos, R.R.S.; Ferraz, V.P. (2008) "Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **99** (8), 3244-3250.

- Oromí-Farrús, M.; Villorbina, G.; Eras, J.; Gatiús, F.; Torres, M.; Canela, R. (2010) "Determination of the iodine value of biodiesel using $^1\text{H-NMR}$ with 1,4-dioxane as an internal standard". *Fuel*, **89** (11), 3489-3492.
- Pahl, G. (2005) "Biodiesel. Growing a new energy economy". Second Edition. Chelsea Green Publishing Company. Canada. ISBN 13: 9781933392967.
- Papadopoulos, C.E.; Lazaridou, A.; Koutsoumba, A.; Kokkinos, N.; Christoforidis, A.; Nikolaou, N. (2010) "Optimization of cotton seed biodiesel quality (critical properties) through modification of its FAME composition by highly selective homogeneous hydrogenation". *Bioresource Technology*, **101** (6), 1812-1819.
- Pappu, V.K.S.; Yanez, A.J.; Peereboom, L.; Muller, E.; Lira, C.T.; Miller, D.J. (2011) "A kinetic model of the Amberlyst-15 catalyzed transesterification of methyl stearate with n-butanol". *Bioresource Technology*, **102** (5), 4270-4272.
- Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. (2008) "Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant". *Bioresource Technology*, **99** (8), 3130-3135.
- Pasqualino, J.C. (2006) "Cynara cardunculus as an alternative crop for biodiesel production". Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- Pasqualino, J.C.; Montané, D.; Salvadó, J. (2006) "Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels". *Biomass and Bioenergy*, **30** (10), 874-879.
- Patil, P.D.; Deng, S. (2009) "Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils". *Fuel*, **88** (7), 1302-1306.
- Paz Antolin, I.; Molero Meneses, M. (2001) "Efecto catalítico de los metales sobre la estabilidad térmica de los aceites de oliva". *Grasas y Aceites*, **52** (6), 373-379.
- Pehlivan, E.; Arslan, G.; Gode, F.; Altun, T.; Musa Özcan, M. (2008) "Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)". *Grasas y Aceites*, **59** (3), 239-244.
- Pereda Marín, J.; Barriga Mateos, F.; Álvarez Mateos, P. (2003) "Aprovechamiento de las oleinas residuales procedentes del proceso de refinado de los aceites vegetales comestibles para la fabricación de biodiesel". *Grasas y Aceites*, **54** (2), 130-137.
- Pereira, R.G.; Oliveira, C.D.; Oliveira, J.L.; Oliveira, P.C.P.; Fellows, C.E.; Piamba, O.E. (2007) "Exhaust emissions and electric energy generation in a stationary engine using blends of diesel and soybean biodiesel". *Renewable Energy*, **32** (14), 2453-2460.
- Pereira, J.S.F.; Moraes, D.P.; Antes, F.G.; Diehl, L.O.; Santos, M.F.P.; Guimaraes, R.C.L.; Fonseca, T.C.O.; Dressler, V.L.; Flores, E.M.M. (2010) "Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oils by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion". *Microchemical Journal*, **96** (1), 4-11.
- Pereyra-Irujo, G.A.; Izquierdo, N.G.; Covi, M.; Nolasco, S.M.; Quiroz, F.; Aguirrezábal, L.A.N.; (2009) "Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: A simulation study". *Biomass and Bioenergy*, **33** (3), 459-468.
- Pérez-Camino, M.C.; Moreda, W.; Cert, A. (2001) "Effects of olive fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerol content of virgin olive oils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (2), 699-704.
- Pérez, A.; Casas, A.; Fernández, C.M.; Ramos, M.J.; Rodríguez, L. (2010) "Winterization of peanut biodiesel to improve the cold flow properties". *Bioresource Technology*, **101** (19), 7375-7381.
- Phan, A.N.; Phan, T.M. (2008) "Biodiesel production from waste cooking oils". *Fuel*, **87** (17-18), 3490-3496.
- Picariello, G.; Sacchi, R.; Addeo, F. (2007) "One-step characterization of triacylglycerols from animal fats by MALDI-TOF MS". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109** (5), 511-524.
- Picariello, G.; Paduano, A.; Sacchi, R.; Addeo, R. (2009) "MALDI-TOF mass spectrometry profiling of polar and nonpolar fractions in heated vegetable oils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (12), 5391-5400.
- Pinto, A.C.; Guarieiro, L.L.N.; Rezende, M.J.C.; Ribeiro, N.M.; Torres, E.A.; Lopes, W.A.; Pereira, P.A.P.; de Andrade, J.B. (2005) "Biodiesel: An Overview". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16** (6B), 1313-1330.
- Pinto, P.; Saraiva, M.L.; Lima J.L. (2006) "A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system". *Analytica Chimica Acta*, **555** (2), 377-383.
- Pinzi, S.; Garcia, I.L.; Lopez-Gimenez, F.J.; de Castro, M.D.L.; Dorado, G.; Dorado, M.P. (2009) "The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications". *Energy & Fuels*, **23** (5), 2325-2341.
- Pirola, C.; Carvoli, G.; Ragaini, V.; Bianchi, C.L.; Boffito, D.C.; Barnabè, D. (2010) "Feasibility study for the production of biofuels from *Brassicaceae* spp. and *Nicotiana tabacum* oilseeds and from by-products or waste materials". *Journal of Biotechnology*, **150** (1), 173.

- Pisarello, M.L.; Dalla Costa, B.; Mendow, G.; Querini, C.A. (2010) "Esterification with ethanol to produce biodiesel from high acidity raw materials: Kinetic studies and analysis of secondary reactions". *Fuel Processing Technology*, **91** (9), 1005-1014.
- Polavka, J.; Paligová, J.; Cvengroš, J.; Simon, P. (2005) "Oxidation stability of methyl esters studied by differential thermal analysis and rancimat". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **82** (7), 519-524.
- Porte, A.F.; de Souza Schneider, R.C.; Kaercher, J.A.; Klamt, R.A.; Schmatz, W.L.; Teixeira da Silva, W.L.; Filho, W.A.S. (2010) "Sunflower biodiesel production and application in family farms in Brazil". *Fuel*, **89** (12), 3718-3724.
- Pramanik, K. (2003) "Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine". *Renewable Energy*, **28**(2), 239-248.
- Predojević, Z.J. (2008) "The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps". *Fuel*, **87** (17-18), 3522-3528.
- Puhan, S.; Vedaraman, N.; Ram, B.V.V.; Sankarnarayanan, G.; Jeychandran, K. (2005) "Mahua oil (*Madhuca indica* seed oil) methyl ester as biodiesel-preparation and emission characteristics". *Biomass and Bioenergy*, **28** (1), 87-93.
- Qian, J.; Shi, H.; Yun, Z. (2010) "Preparation of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil produced by two-phase solvent extraction". *Bioresource Technology*, **101** (18), 7025-7031.
- Ragonese, C.; Tranchida, P.Q.; Sciarrone, D.; Mondello, L. (2009) "Conventional and fast gas chromatography analysis of biodiesel blends using an ionic liquid stationary phase". *Journal of Chromatography A*, **1216** (51), 8992-8997.
- Rajendra, M.; Jena, P.C.; Raheman, H. (2009) "Prediction of optimized pretreatment process parameters for biodiesel production using ANN and GA". *Fuel*, **88** (5), 868-875.
- Rakopoulos, C.D.; Antonopoulos, K.A.; Rakopoulos, D.C.; Hountalas, D.T.; Giakoumis, E.G. (2006) "Comparative performance and emissions study of a direct injection diesel engine using blends of diesel fuel with vegetable oils or bio-diesels of various origins". *Energy Conversion and Management*, **47** (18-19), 3272-3287.
- Ramadhas, A.S.; Jayaraj, S.; Muraleedharan, C. (2004) "Use of vegetable oils as I.C. engine fuels - A review". *Renewable Energy*, **29** (5), 727-742.
- Ramadhas, A.S.; Jayaraj, S.; Muraleedharan, C. (2005) "Biodiesel production from high FFA rubber seed oil". *Fuel*, **84** (4), 335-340.
- Ramadhas, A.S.; Jayaraj, S.; Muraleedharan, C.; Padmakumari, K. (2006) "Artificial neural networks used for the prediction of the cetane number of biodiesel". *Renewable Energy*, **31** (15), 2524-2533.
- Ramos, M.J.; Casas, A.; Rodríguez, L.; Romero, R.; Pérez, A. (2008) "Transesterification of sunflower oil over zeolites using different metal loading: A case of leaching and agglomeration studies". *Applied Catalysis A: General*, **346** (1-2), 79-85.
- Ramos, M.J.; Fernández, C.M.; Casas, A.; Rodríguez, L.; Pérez, A. (2009) "Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties". *Bioresource Technology*, **100** (1), 261-268.
- Ranalli, A.; Pollastri, L.; Contento, S.; Di Loreto, G.; Iannucci, E.; Lucera, L.; Russi, F. (2002) "Acyglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (13), 3775-3779.
- Rao, G.L.N.; Sampath, S.; Rajagopal, K. (2007) "Experimental studies on the combustion and emission characteristics of a diesel engine fuelled with used cooking oil methyl ester and its diesel blends". *International Journal of Applied Science, Engineering and Technology*, **4** (2), 64-70.
- Rashid, U.; Anwar, F.; Moser, B.R.; Ashraf, S. (2008) "Production of sunflower oil methyl esters by optimized alkali-catalyzed methanolysis". *Biomass and Bioenergy*, **32** (12), 1202-1205.
- Rashid, U.; Anwar, F.; Knothe, G. (2009) "Evaluation of biodiesel obtained from cottonseed oil". *Fuel Processing Technology*, **90** (9), 1157-1163.
- Ratnayake, W.M.N.; Hansen, S.L.; Kennedy, M.P. (2006) "Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method Ce 1h-05: Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC method". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **83** (6), 475-488.
- Rattanaphra, D.; Srinophakun, P. (2010) "Biodiesel production from crude sunflower oil and crude *jatropha* oil using immobilized lipase". *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **43** (1), 104-108.
- Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles (BOE nº 44, 21 febrero 1983).

- Real Decreto 61/2006, de 31 de enero, por el que se determinan las especificaciones de gasolinas, gasóleos, fuelóleos y gases licuados del petróleo y se regula el uso de determinados biocarburantes (BOE nº 41, 17 febrero 2006).
- Real Decreto 1716/2010, de 17 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles (BOE nº 317, 30 diciembre 2010).
- Reed, T.B.; Graboski, M.S.; Gaur, S. (1992) "Development and commercialization of oxygenated diesel fuels from waste vegetable oils". *Biomass and Bioenergy*, **3** (2), 111-115.
- Reefat, A.A.; Attia, N.K.; Sibak, H.A.; El Sheltawy, S.T.; El Diwani, G.I. (2008) "Production, optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil". *International journal of Environmental Science and Technology*, **5** (1), 75-82.
- Refaat, A.A. (2010) "Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil". *International journal of Environmental Science and Technology*, **7** (1), 183-213.
- Roca, A.; Cabrera, C.; Lorenzo, M.L.; López, M.C. (2000) "Niveles de Ca, Mg, Mn, Zn, Se y Cr en aceites de oliva comercializados en Andalucía". *Grasas y Aceites*, **51** (6), 393-399.
- Roca, A.; Cabrera, C.; Lorenzo, M.L.; López, M.C. (2001) "Contenido de plomo y cadmio en aceites de girasol". *Grasas y Aceites*, **52** (3-4), 229-234.
- Rodolfi, L.; Zittelli, G.C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. (2009) "Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor". *Biotechnology and Bioengineering*, **102** (1), 100-112.
- Romano, R.; Riccio, F.; Borriello, I.; Toraldo, G. (2007) "Catalytic effect of Cu (II) and Fe (III) on kinetic oxidation of fatty substances: The soybean oil case". *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **84** (1), 25-32.
- Ruiz-Méndez, M.V.; Marmesat, S.; Liotta, A. Dobarganes, M.C. (2008) "Analysis of used frying fats for the production of biodiesel". *Grasas y Aceites*, **59** (1), 45-50.
- Ruiz-Samblás, C.; González-Casado, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Rodríguez García, F.P. (2010) "Application of selected ion monitoring to the analysis of triacylglycerols in olive oil by high temperature-gas chromatography/mass spectrometry". *Talanta*, **82** (1), 255-260.
- Ryu, K. (2010) "The characteristics of performance and exhaust emissions of a diesel engine using a biodiesel with antioxidants". *Bioresource Technology*, **101**(1), S78-S82.
- Sabudak, T.; Yildiz, M. (2010) "Biodiesel production from waste frying oils and its quality control". *Waste Management*, **30** (5), 799-803.
- Şahan, Y.; Basoglu, F.; Gücer, S. (2007) "ICP-MS analysis of a series of metals (namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey". *Food Chemistry*, **105** (1), 395-399.
- Sahoo, P.K.; Das, L.M.; Babu, M.K.G.; Naik, S.N. (2007) "Biodiesel development from high acid value polanga seed oil and performance evaluation in a CI engine". *Fuel*, **86** (3), 448-454.
- Sahoo, P.K.; Das, L.M. (2009) "Process optimization for biodiesel production from jatropha, karanja and polanga oils". *Fuel*, **88**(9), 1588-1594.
- Saint'Pierre, T.D.; Diasa, L.F.; Pozebon, D.; Aucelio, R.Q.; Curtius, A.J.; Welz, B. (2002) "Determination of Cu, Mn, Ni and Sn in gasoline by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and emulsion sample introduction". *Spectrochimica Acta Part B*, **57** (12), 1991-2001.
- Saint'Pierre, T.D.; Dias, L.F.; Maia, S.M.; Curtius, A.J. (2004) "Determination of Cd, Cu, Fe, Pb and Tl in gasoline as emulsion by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry with analyte addition and isotope dilution calibration techniques". *Spectrochimica Acta Part B*, **59** (4), 551-558.
- Saloua, F.; Saber, C.; Hedi, Z. (2010) "Methyl ester of [*Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider] seed oil: Biodiesel production and characterization". *Bioresource Technology*, **101** (9), 3091-3096.
- Samadi, A.; Andreu, I.; Ferreri, C.; Dellonte, S.; Chatgililoglu, C. (2004) "Thiyl radical-catalyzed isomerization of oils: An entry to the trans lipid library". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **81** (8), 753-758.
- Samios, D.; Pedrotti, F.; Nicolau, A.; Reiznautt, Q.B.; Martini, D.D.; Dalcin, F.M. (2009) "A transesterification double step process-TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides". *Fuel Processing Technology*, **90** (4), 599-605.
- San José Alonso, J.; López Sastre, J.A.; Romero Ávila, C.; López, E. (2008) "A note on the combustion of blends of diesel and soya, sunflower and rapeseed vegetable oils in a light boiler". *Biomass and Bioenergy*, **32** (9), 880-886.
- Santos, F.F.P.; Malveira, J.Q.; Cruz, M.G.A.; Fernandes, F.A.N. (2010) "Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil". *Fuel*, **89** (2), 275-279.

- Saraf, S.; Thomas, B. (2007) "Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality". *Process Safety and Environmental Protection*, **85** (5), 360-364.
- Saraiva, S.A.; Cabral, E.C.; Eberlin, M.N.; Catharino, R.R. (2009) "Amazonian vegetable oils and fats: Fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (10), 4030-4034.
- Sarin, R.; Kumar, R.; Srivastav, B.; Puri, S.K.; Tuli, D.K.; Malhotra, R.K.; Kumar, A. (2009) "Biodiesel surrogates: Achieving performance demands". *Bioresource Technology*, **100** (12), 3022-3028.
- Sarin, A.; Arora, R.; Singh, N.P.; Sarin, R.; Sharma, M.; Malhotra, R.K. (2010) "Effect of metal contaminants and antioxidants on the oxidation stability of the methyl ester of pongamia". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **87** (5), 567-572.
- SathyaSelvabala, V.; Varathachary, T.K.; Selvaraj, D.K.; Ponnusamy, V.; Subramanian, S. (2010) "Removal of free fatty acid in *Azadirachta indica* (Neem) seed oil using phosphoric acid modified mordenite for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **101** (15), 5897-5902.
- SathyaSelvabala, V.; Selvaraj, D.K.; Kalimuthu, J.; Periyaraman, P.M.; Subramanian S. (2011) "Two-step biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil: Optimization of modified β -zeolite catalyzed pre-treatment". *Bioresource Technology*, **102** (2), 1066-1072.
- Sawangkeaw, R.; Bunyakiat, K.; Ngamprasertsith, S. (2010) "A review of laboratory-scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol (2001–2009)". *The Journal of Supercritical Fluids*, **55** (1), 1-13.
- Saydut, A.; Duz, M.Z.; Kaya, C.; Kafadar, A.B.; Hamamci, C. (2008) "Transesterified sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil as a biodiesel fuel". *Bioresource Technology*, **99** (14), 6656-6660.
- Schiller, J.; Arnhold, J.; Benard, S.; Müller, M.; Reichl, S.; Arnold, K. (1999) "Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach". *Analytical Biochemistry*, **267** (1), 46-56.
- Schiller, J.; Arnold, K. (2000) "Mass spectrometry in structural biology". *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R.A., Ed.; John Wiley & Sons Ltd.; New York; 559-585.
- Schiller, J.; Süß, R.; Petkovic, M.; Arnold, K. (2002a) "Thermal stressing of unsaturated vegetable oils: Effects analysed by MALDI-TOF mass spectrometry, ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy". *European Food Research and Technology*, **215** (4), 282-286.
- Schiller, J.; Süß, R.; Petkovic, M.; Hanke, G.; Vogel, A.; Arnold, K. (2002b) "Effects of thermal stressing on saturated vegetable oils and isolated triacylglycerols-product analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, NMR and IR spectroscopy". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104** (8), 496-505.
- Schiller, J.; Süß, R.; Petkovic, M.; Arnold, K. (2002c) "Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and ^{31}P NMR spectroscopy". *Journal of Food Lipids*, **9** (3) 185-200.
- Schiller, J.; Süß, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Leßig, J.; Müller, M.; Petković, M.; Spalteholz, H.; Zschörnig, O.; Arnold, K. (2004) "Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research". *Progress in Lipid Research*, **43** (5), 449-488.
- Schinas, P.; Karavalakis, G.; Davaris, C.; Anastopoulos, G.; Karonis, D.; Zannikos, F.; Stournas, S.; Lois, E. (2009) "Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil as an alternative feedstock for the production of biodiesel in Greece". *Biomass and Bioenergy*, **33** (1), 44-49.
- Schmidt, K.; Van Gerpen, J.H. (1996) "The effect of biodiesel fuel composition on diesel combustion and emissions". *Society for Automotive Engineers*, paper n° 961086.
- Schober, S.; Seidl, I.; Mittelbach, M. (2006) "Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108** (4), 309-314.
- Schober, S.; Seidl, I.; Meinitzer, A.; Mittelbach, M. (2009) "A method for the determination of polyunsaturated fatty acid methyl esters in biodiesel: Results of an interlaboratory study". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111** (8), 829-834.
- Schreiner, M. (2005) "Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy". *Journal of Chromatography A*, **1095** (1-2), 126-130.
- Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. (1998) "Transesterification of vegetable oils: A review". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **9** (1), 199-210.
- Semwal, S.; Arora, A.K.; Badoni, R.P.; Tuli, D.K. (2011) "Biodiesel production using heterogeneous catalysts: A review". *Bioresource Technology*, **102** (3), 2151-2161.

- Sharma, Y.C.; Singh, B.; Upadhyay, S.N. (2008) "Advancements in development and characterization of biodiesel: A review". *Fuel*, **87** (12), 2355-2373.
- Sharma, Y.C.; Singh, B. (2009) "Development of biodiesel: Current scenario". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13** (6-7), 1646-1651.
- Sharma, Y.C.; Singh, B.; Korstad, J. (2011) "Latest developments on application of heterogenous basic catalysts for an efficient and eco friendly synthesis of biodiesel: A review". *Fuel*, **90** (4), 1309-1324.
- Silva, J.S.A.; Chaves, E.S.; dos Santos, E.J.; Saint'Pierre, T.D.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. (2010) "Calibration techniques and modifiers for the determination of Cd, Pb and Tl in biodiesel as microemulsion by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **21** (4), 620-626.
- Silva, G.F.; Camargo, F.L.; Ferreira, A.L.O. (2011) "Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol". *Fuel Processing Technology*, **92** (3), 407-413.
- Šimáček, P.; Kubička, D.; Šebor, G.; Pospíšil, M. (2010) "Fuel properties of hydroprocessed rapeseed oil". *Fuel*, **89** (3), 611-615.
- Simas, R.C.; Catharino, R.R.; Cunha, I.B.; Cabral, E.C.; Barrera-Arellano, D.; Eberlin, M.N.; Alberici, R.M. (2010) "Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry". *Analyst*, **135** (4), 738-744.
- Singh, S.P.; Singh, D. (2010) "Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14** (1), 200-216.
- Sinha, S.; Agarwal, A.K.; Garg, S. (2008) "Biodiesel development from rice bran oil: Transesterification process optimization and fuel characterization". *Energy Conversion and Management*, **49** (5), 1248-1257.
- Smith, P.C.; Ngothai, Y.; Nguyen, Q.D.; O'Neill, B.K. (2010) "Improving the low-temperature properties of biodiesel: Methods and consequences". *Renewable Energy*, **35** (6), 1145-1151.
- Song, J.; Alam, M.; Boehman, A.L.; Kim, U. (2006) "Examination of the oxidation behaviour of biodiesel soot". *Combustion and Flame*, **146** (4), 589-604.
- Srivastava, A.; Prasad, R. (2000) "Triglycerides-based diesel fuels". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **4** (2), 111-133.
- Srivastava, P.K.; Verma, M. (2008) "Methyl ester of karanja oil as an alternative renewable source energy" *Fuel*, **87** (8-9), 1673-1677.
- Stübiger, G.; Pittenauer, E.; Allmaier, G. (2003) "Characterisation of castor oil by on-line and off-line non-aqueous reverse-phase high performance liquid chromatography-mass spectrometry (APCI and UV/MALDI)". *Phytochemical Analysis*, **14** (6), 337-346.
- Sumathi, S.; Chai, S.P.; Mohamed, A.R. (2008) "Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **12** (9), 2404-2421.
- Sung Lin, Y.; Ping Lin, H. (2010) "Study on the spray characteristics of methyl esters from waste cooking oil at elevated temperature". *Renewable Energy*, **35** (9), 1900-1907.
- Szybist, J.P.; Boehman, A.L.; Taylor, J.D.; McCormick, R.L. (2005) "Evaluation of formulation strategies to eliminate the biodiesel NO_x effect". *Fuel Processing Technology*, **86** (10), 1109-1126.
- Tang, H.; Salley, S.O.; Simon Ng, K.Y. (2008) "Fuel properties and precipitate formation at low temperature in soy-, cottonseed-, and poultry fat-based biodiesel blends". *Fuel*, **87** (13-14), 3006-3017.
- Tashtoush, G.M.; Al-Widyan, M.I.; Al-Jarrah, M.M. (2004) "Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel". *Energy Conversion and Management*, **45** (17), 2697-2711.
- Tate, R.E.; Watts, K.C.; Allen, C.A.W.; Wilkie, K.I. (2006) "The viscosities of three biodiesel fuels at temperatures up to 300 °C". *Fuel*, **85** (7-8), 1010-1015.
- Teuber, K.; Schiller, J.; Fuchs, B.; Karas, M.; Jaskolla, T.W. (2010) "Significant sensitivity improvements by matrix optimization: A MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk". *Chemistry and Physics of Lipids*, **163** (6), 552-560.
- Thanh, L.T.; Okitsu, K.; Sadanaga, Y.; Takenaka, N.; Maeda, Y.; Bandow, H. (2010) "A two-step continuous ultrasound assisted production of biodiesel fuel from waste cooking oils: A practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel". *Bioresource Technology*, **101** (14), 5394-5401.
- Tiwari, A.K.; Kumar, A.; Raheman, H. (2007) "Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process". *Biomass and Bioenergy*, **31** (8), 569-575.

- Tiyapongpattana, W.; Wilairat, P.; Marriott, P.J. (2008) "Characterization of biodiesel and biodiesel blends using comprehensive two-dimensional gas chromatography". *Journal of Separation Science*, **31 (14)**, 2640-2649.
- Tomasevic, A.V.; Siler-Marinkovic, S.S. (2003) "Methanolysis of used frying oil". *Fuel Processing Technology*, **81 (1)**, 1-6.
- Trujillo Hernández, N.M. (2009) "Obtención de biodiesel. Estudio de estabilidad". Proyecto Fin de Carrera. Universidad de La Laguna, Tenerife, España.
- UNE-EN 116 (Noviembre 1998) Gasóleos de automoción y de calefacción. Determinación del punto de obstrucción de filtros en frío.
- UNE-EN 116/AC (Octubre 1999) Gasóleos de automoción y de calefacción. Determinación del punto de obstrucción de filtros en frío.
- UNE-EN 116:1998 Erratum (Abril 2006) Gasóleos de automoción y de calefacción. Determinación del punto de obstrucción de filtros en frío.
- UNE-EN 590 (Octubre 2009) Combustibles para automoción. Combustibles para motor diesel (gasóleo). Requisitos y métodos de ensayo.
- UNE-EN 12662 (Diciembre 2008) Productos petrolíferos líquidos. Determinación de la contaminación en destilados medios.
- UNE-EN 12916:2007. Productos petrolíferos. Determinación de los tipos de hidrocarburos aromáticos en destilados medios. Método por cromatografía líquida de alta eficacia con detección del índice de refracción.
- UNE-EN 14078:2010. Productos petrolíferos líquidos. Determinación del contenido en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de destilados medios. Método por espectroscopía infrarroja.
- UNE-EN 14103 (Septiembre 2003) Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linoleico.
- UNE-EN 14103:2003 Erratum (Julio 2009) Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linoléico.
- UNE-EN 14104 (Septiembre 2003) Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del índice de acidez.
- UNE-EN 14105 (Octubre 2003) Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de los contenidos de glicerol libre y total y de mono-, di- y triglicéridos. Método de referencia.
- UNE-EN 14106 (Septiembre 2003) Productos derivados de grasas y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de glicerol libre.
- UNE-EN 14107 (Septiembre 2003) Productos derivados de grasas y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de fósforo mediante espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivo (ICP).
- UNE-EN 14108 (Octubre 2003) Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de sodio mediante espectrometría de absorción atómica.
- UNE-EN 14109 (Octubre 2003) Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de potasio mediante espectrometría de absorción atómica.
- UNE-EN 14110 (Octubre 2003) Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de metanol.
- UNE-EN 14111 (Octubre 2003) Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del índice de yodo.
- UNE-EN 14112 (Octubre 2003) Derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de la estabilidad a la oxidación (ensayo de oxidación acelerada).
- UNE-EN 14214 (Diciembre 2003) Combustibles de automoción. Ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) para motores diesel. Requisitos y métodos de ensayo.
- UNE-EN 14214:2003/AC (Diciembre 2007) Combustibles de automoción. Ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) para motores diesel. Requisitos y métodos de ensayo.
- UNE-EN 14214:2003 Erratum (Mayo 2008) Combustibles de automoción. Ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) para motores diesel. Requisitos y métodos de ensayo.
- UNE-EN 14214 (Junio 2009) Combustibles de automoción. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diesel. Requisitos y métodos de ensayo.

- UNE-EN 14214:2009+A1 (Marzo 2010) Combustibles de automoción. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diesel. Requisitos y métodos de ensayo.
- UNE-EN 14538 (Noviembre 2006) Productos derivados de grasas y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de Ca, K, Mg y Na por análisis espectral de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP OES).
- UNE-EN 15751 (Diciembre 2009) Combustibles para automoción. Éster metílico de ácidos grasos (FAME) y mezclas con diesel. Determinación de la estabilidad a la oxidación según el método de la oxidación acelerada.
- UNE-EN 15779:2010. Productos petrolíferos y derivados de grasas y aceites. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diésel. Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados (≥ 4 enlaces dobles) (PUFA) por cromatografía de gases.
- UNE-EN ISO 662 (Septiembre 2001) Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del contenido de humedad y de materias volátiles (ISO 662:1998).
- UNE-EN ISO 2160 (Julio 1999) Productos petrolíferos. Acción corrosiva sobre el cobre. Ensayo de la lámina de cobre.
- UNE-EN ISO 2719 (Julio 2003) Determinación del punto de inflamación. Método Pensky-Martens en vaso cerrado (ISO 2719:2002).
- UNE-EN ISO 2719:2003 Erratum (Diciembre 2007) Determinación del punto de inflamación. Método Pensky-Martens en vaso cerrado (ISO 2719:2002).
- UNE-EN ISO 3104:1996 Productos petrolíferos. Líquidos transparentes y opacos. Determinación de la viscosidad cinemática y cálculo de la viscosidad dinámica (ISO 3104:1994).
- UNE-EN ISO 3104 Erratum (Diciembre 1996) Productos petrolíferos. Líquidos transparentes y opacos. Determinación de la viscosidad cinemática y cálculo de la viscosidad dinámica (ISO 3104:1994).
- UNE-EN ISO 3104/AC (Febrero 1999) Productos petrolíferos. Líquidos transparentes y opacos. Determinación de la viscosidad cinemática y cálculo de la viscosidad dinámica (ISO 3104:1994).
- UNE-EN ISO 3675 (Julio 1999) Petróleo crudo y productos petrolíferos líquidos. Determinación de la densidad en laboratorio. Método del areómetro (ISO 3675:1998).
- UNE-EN ISO 3679 (Octubre 2004) Determinación del punto de inflamación. Método del equilibrio rápido en vaso cerrado (ISO 3679:2004).
- UNE-EN ISO 3960 (Julio 2009) Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de peróxido. Determinación de punto final yodométrico (visual) (ISO 3690:2007).
- UNE-EN ISO 4264:2007. Productos petrolíferos. Cálculo del índice de cetano de los destilados medios por la ecuación de las cuatro variables. (ISO 4264:2007).
- UNE-EN ISO 5165 (Junio 1999) Productos petrolíferos. Determinación de la calidad de ignición de los combustibles diesel. Método del motor de cetano (ISO 5165:1998).
- UNE-EN ISO 6245:2003. Productos petrolíferos. Determinación del contenido en cenizas. (ISO 6245: 2001).
- UNE-EN ISO 10370 (Mayo 1996) Productos petrolíferos. Determinación del residuo carbonoso. Micro-método (ISO 10370:1993).
- UNE-EN ISO 12185 (Marzo 1999) Petróleo crudo y productos petrolíferos. Determinación de la densidad. Método del tubo en U oscilante (ISO 12185:1996).
- UNE-EN ISO 12205:1996. Productos petrolíferos. Determinación de la estabilidad a la oxidación de los combustibles destilados medios. (ISO 12205:1995).
- UNE-EN ISO 12937 (Marzo 2001) Productos petrolíferos. Determinación de agua. Método de Karl Fischer por valoración coulombimétrica (ISO 12937:2000).
- UNE-EN ISO 12937 Erratum (Enero 2008) Productos petrolíferos. Determinación de agua. Método de Karl Fischer por valoración coulombimétrica (ISO 12937:2000).
- UNE-EN ISO 20846 (Octubre 2004) Productos petrolíferos. Determinación del contenido total de azufre en combustibles de automoción. Método por fluorescencia ultravioleta (ISO 20846:2004).
- UNE-EN ISO 20884 (Octubre 2004) Productos petrolíferos. Determinación del contenido total de azufre en combustibles de automoción. Espectrometría de fluorescencia de rayos X de longitud de onda dispersiva (ISO 20884:2004).
- Utlu, Z. (2007) "Evaluation of biodiesel obtained from waste cooking oil". *Energy Sources, Part A*, **29 (14)**, 1295-1304.

- Utlu, Z.; Kocak, M.S. (2008) "The effect of biodiesel fuel obtained from waste cooking oil on direct injection diesel engine performance and exhaust emissions". *Renewable Energy*, **33** (8), 1936-1941.
- Veljković, V.B.; Lakićević, S.H.; Stamenković, O.S.; Todorović, Z.B.; Lazić, M.L. (2006) "Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids". *Fuel*, **85** (17-18), 2671-2675.
- Venkanna, B.K.; Reddy, C.V. (2009) "Biodiesel production and optimization from *Calophyllum inophyllum* linn oil (honne oil) - A three stage method". *Bioresource Technology*, **100** (21), 5122-5125.
- Verleyen, T.; Verhe, R.; Garcia, L.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; De Greyt, W. (2001) "Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate". *Journal of Chromatography A*, **921** (2), 277-285.
- Vicente, G.; Coteron, A.; Martinez, M.; Aracil, J. (1998) "Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production". *Industrial Crops and Products*, **8** (1), 29-35.
- Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J. (2004) "Integrated biodiesel production: A comparison of different homogeneous catalysts systems". *Bioresource Technology*, **92** (3), 297-305.
- Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J. (2005) "Optimization of *Brassica carinata* oil methanolysis for biodiesel production". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **82** (12), 899-904.
- Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J. (2007a) "Optimisation of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield". *Bioresource Technology*, **98** (9), 1724-1733.
- Vicente, G.; Martínez, M.; Aracil, J. (2007b) "Optimisation of integrated biodiesel production. Part II: A study of the material balance". *Bioresource Technology*, **98** (9), 1754-1761.
- Vicente, G.; Bautista, L.F.; Rodríguez, R.; Gutiérrez, F.J.; Sádaba, I.; Ruiz-Vázquez, R.M.; Torres-Martínez, S.; Garre, V. (2009) "Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus". *Biochemical Engineering Journal*, **48** (1), 22-27.
- Vieira, M.A.; Castro de Oliveira, L.G.; Araujo Gonçalves, R.; de Souza, V.; de Campos, R.C. (2009) "Determination of As in vegetable oil and biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Energy & Fuels*, **23** (12), 5942-5946.
- Visioli, F.; Galli, C. (1998) "Olive oil phenols and their potential effects on human health". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** (10), 4292-4296.
- Wang, W.G.; Lyons, D.W.; Clark, N.N.; Gautam, M.; Norton, P.M. (2000) "Emissions from nine heavy trucks fuelled by diesel and biodiesel blend without engine modification". *Environmental Science and Technology*, **34** (6), 933-939.
- Wang, Y.; Ou, S.; Liu, P.; Xue, F.; Tang, S. (2006) "Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **252** (1-2), 107-112.
- Wang, Y.; Ou, S.; Liu, P.; Zhang, Z. (2007) "Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process". *Energy Conversion Management*, **48** (1), 184-188.
- Wassell, C.S.; Dittmer, T.P. (2006) "Are subsidies for biodiesel economically efficient?". *Energy Policy*, **34** (18), 3993-4001.
- Watanabe, Y.; Pinsirodom, P.; Nagao, T.; Yamauchi, A.; Kobayashi, T.; Nishida, Y.; Takagi, Y.; Shimada, Y. (2008) "Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **44** (3-4), 99-105.
- Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. (2001) "Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78** (7), 703-707.
- Wen, Z.; Yu, X.; Tu, S.T.; Yan, J.; Dahlquist, E. (2009) "Intensification of biodiesel synthesis using zigzag micro-channel reactors". *Bioresource Technology*, **100** (12), 3054-3060.
- Wen, Z.; Yu, X.; Tu, S.T.; Yan, J.; Dahlquist, E. (2010a) "Synthesis of biodiesel from vegetable oil with methanol catalyzed by Li-doped magnesium oxide catalysts". *Applied Energy*, **87** (3), 743-748.
- Wen, Z.; Yu, X.; Tu, S.T.; Yan, J.; Dahlquist, E. (2010b) "Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by TiO₂-MgO mixed oxides". *Bioresource Technology*, **101** (24), 9570-9576.
- White Paper on Internationally Compatible Biofuel Standards (2007). Tripartite Task Force Brazil, European Union and United States of America. National Institute of Standards and Technology (NIST).
- Winayanuwattikun, P.; Kaewpiboon, C.; Piriyananon, K.; Tantong, S.; Thakernarnkit, W.; Chulalaksananukul, W.; Yongvanich, T. (2005) "Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand". *Biomass and Bioenergy*, **32** (12), 1279-1286.

- Wiesman, Z.; Chapagain, B.P. (2010) "Determination of fatty acid profiles and TAGs in vegetable oils by MALDI-TOF/MS fingerprinting". *Lipidomics: Methods in Molecular Biology*, **579 (2)**, 315-336. Donald Armstrong (ed.). Springer.
- Woods, G.D.; Fryer, F.I. (2007) "Direct element analysis of biodiesel by inductively coupled plasma mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389 (3)**, 753-761.
- Wu, Z.; Rodgers R.P.; Marshall, A.G. (2004) "Characterization of vegetable oils: Detailed compositional fingerprints derived from ESI-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(17)**, 5322-5328.
- Wyatt, V.T.; Hess, M.A.; Dunn, R.O.; Foglia, T.A.; Haas, M.J.; Marmer, W.N. (2005) "Fuel properties and nitrogen oxide emission levels of biodiesel produced from animal fats". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **82 (8)**, 585-591.
- Xin, J.; Imahara, H.; Saka, S. (2009) "Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidant". *Fuel*, **88 (2)**, 282-286.
- Xu, H.; Miao, X.; Wu, Q. (2006) "High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters". *Journal of Biotechnology*, **126 (4)**, 499-507.
- Yamane, K.; Ueta, A.; Shimamoto, Y. (2004) "Influence of physical and chemical properties of biodiesel fuels on injection, combustion and exhaust emission characteristics in a direct injection compression ignition engine". *International Journal of Engine Research*, **2 (4)**, 249-261.
- Yamamoto, K.; Kinoshita, A.; Shibahara, A. (2008) "Gas chromatographic separation of fatty acid methyl esters on weakly polar capillary columns". *Journal of Chromatography A*, **1182 (1)**, 132-135.
- Ying Koh, M.; Ghazi, T.I.M. (2011) "A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15 (5)**, 2240-2251.
- Yuan, X.; Liu, J.; Zeng, G.; Shi, J.; Tong, J.; Huang G. (2008) "Optimization of conversion of waste rapeseed oil with high FFA to biodiesel using response surface methodology". *Renewable Energy*, **33 (7)**, 1678-1684.
- Yuan Lin, C.; Lin, S.A. (2007) "Effects of emulsification variables on fuel properties of two- and three-phase biodiesel emulsions". *Fuel*, **86 (1-2)**, 210-217.
- Zeiner, M.; Steffan, I.; Cindric, I.J. (2005) "Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: A pilot study on the geographical characterization". *Microchemical Journal*, **81 (2)**, 171-176.
- Zhang, X.; Peterson, C.; Rece, D.; Haws, R.; Moller, G. (1998) "Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment". *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **41 (5)**, 1423-1430.
- Zhang, Y.; Dube, M.A.; McLean, D.D.; Kates, M. (2003a) "Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment". *Bioresource Technology*, **89 (1)**, 1-16.
- Zhang, Y.; Dube, M.A.; McLean, D.D.; Kates, M. (2003b) "Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis". *Bioresource Technology*, **90 (3)**, 229-240.
- Zhang, J.; Jiang, L. (2008) "Acid-catalyzed esterification of *Zanthoxylum bungeanum* seed oil with high free fatty acids for biodiesel production". *Bioresource Technology*, **99 (18)**, 8995-8998.
- Zheng, S.; Kates, M.; Dube, M.A.; McLean, D.D. (2006) "Acid-catalyzed production of biodiesel from waste cooking oil". *Biomass and Bioenergy*, **30 (3)**, 267-272.
- Zhou, W.; Konar, S.; Boocock, D. (2003) "Ethyl esters from the single-phase basecatalyzed ethanolysis of vegetable oils". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80 (4)**, 367-371.
- Zullaikah, S.; Lai, C.C.; Vali, S.R.; Ju, Y.H. (2005) "A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil". *Bioresource Technology*, **96 (17)**, 1889-1896.