



Determinación de condiciones apropiadas para la obtención de ácidos grasos  
libres por hidrólisis enzimática a partir de la estearina de palma

Miguel López Vélez

Informe final para optar al título de bioingeniero

Semestre de Industria

Francisco José Campuzano Cardona, Magister en ingeniería

Álvaro José Herazo Vega, Ingeniero químico.

Universidad de Antioquia

Facultad de ingeniería

Bioingeniería

Medellín

2024

Cita	López [1]
<b>Referencia</b>	[1] M. López, “Determinación de condiciones apropiadas para la obtención de ácidos grasos libres por hidrólisis enzimática a partir de la estearina de palma”, Semestre de Industria, bioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, 2024.
Estilo IEEE (2020)	



**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Dedicatoria**

A mi padre Armando López Florián por su constante apoyo, motivación y cariño a seguir estudiando y formándome como profesional y como persona. A Sherlyn Andrea Guzmán Graciano por su apoyo y constante cariño. A los profesores que hicieron parte de mi formación escolar y profesional por su gran trabajo, vocación y dedicación.

## **Agradecimientos**

A Nutraceutika nutrición funcional SAS por brindarme la oportunidad de trabajar en el área que me especializo y por toda la experiencia adquirida, además de la aplicabilidad de la investigación y la formación brindada en el ámbito industrial. Al ingeniero Álvaro José Herazo, por la asesoría y paciencia brindada en el periodo de adaptación y formación, además de sus preciados consejos y observaciones desde el área de industria aplicada. Al ingeniero José Luis Vélez Pérez por brindarme la oportunidad de potenciar mis capacidades en la industria aplicada además de su acompañamiento y consejos. Al profesor Francisco José Campuzano, por su guía en mi proceso de formación, además de su constante atención a mis dudas y su pronta respuesta frente a las inquietudes presentas, además de brindarme su tiempo para asesorías y correcciones oportunas.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. OBJETIVOS	17
A. Objetivo general	17
B. Objetivos específicos	17
V. MARCO TEÓRICO	18
A. <i>Aceite de palma</i>	18
B. <i>Hidrólisis de aceites</i>	19
a. <i>Temperatura</i>	21
b. <i>Concentración agua/aceite</i>	22
c. <i>Concentración enzima/sustrato</i>	22
d. <i>Otros factores para tener en cuenta</i>	22
C. <i>Características de la lipasa de Candida rugosa</i>	23
a. <i>Lipasas.</i>	23
b. <i>Origen</i>	23
c. <i>Estructura química</i>	24
i. <i>Plegamiento <math>\alpha/\beta</math> hidrolasa</i>	25
ii. <i>Triada catalítica</i>	25
iii. <i>Centro activo</i>	25
d. <i>Especificidad de la enzima</i>	27

i. Regioespecificidad	27
ii. Acilespecificidad	27
iv. Estereoespecificidad	28
D. <i>Mecanismo de reacción enzimática</i>	28
E. <i>Estadística descriptiva.</i>	29
a. <i>Metodología de superficie de respuesta</i>	29
b. <i>Veracidad del modelo</i>	31
c. <i>Métricas del modelo obtenido.</i>	32
VI. ANTECEDENTES	34
VII. METODOLOGÍA	36
A. <i>Diseño del experimento</i>	36
B. <i>Fase experimental</i>	37
a. <i>Medición de acidez</i>	38
b. <i>Medición de punto de fusión</i>	39
C. <i>Procesamiento de datos</i>	39
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
A. <i>Modelo matemático</i>	41
B. <i>Comprobación del modelo</i>	46
C. <i>Análisis de costos</i>	47
D. <i>Comparación del producto final con muestras comerciales.</i>	52
IX. CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	58
ANEXOS	63

## LISTA DE TABLAS

TABLA I. PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE ESTEARINA ADAPTADO DE PODCHONG <i>ET AL</i> [29].	19
TABLA II. NIVELES ESTABLECIDOS PARA EL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN	36
TABLA III. RESULTADOS DEL AJUSTE DEL MODELO PARA PREDECIR ACIDEZ.	42
TABLA IV. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LEVENE PARA LAS VARIABLES INDEPENDIENTES	43
TABLA V. CONDICIONES ADECUADAS PARA LAS GENERACIÓN DE FFA.	46
TABLA VI. VALOR PREDICHO CON LAS CONDICIONES ADECUADAS	46
TABLA VII. RESULTADOS DE PRUEBAS ADICIONALES CON LAS CONDICIONES ADICIONALES.	46
TABLA VIII. COMPARACIÓN DE PUNTO DE FUSIÓN INICIAL Y FINAL.	47
TABLA IX. COSTOS DEL PERSONAL DE PLANTA.	47
TABLA X. COSTOS DE INFRAESTRUCTURA DE PLANTA Y PERSONAL.	48
TABLA XI. COSTOS DE MATERIA PRIMA.	48
TABLA XII. COMPARACIÓN DEL PRODUCTO OBTENIDO CON MUESTRAS COMERCIALES.	52
TABLA XIII. COMPOSICIÓN DE FAME ADQUIRIDO POR AFIFAH <i>ET AL</i> [62].	53

## LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos libres[24].	20
Fig 2. Etapas de la hidrolisis catalizada mediante lipasas [30].	21
Fig 3. Estructura tridimensional y genérica de la lipasa [41].	26
Fig 4. Estructura real de la 1LPO una CRL [47].	26
Fig 5. PDB 1CRL, en azul esta su conformación con <i>lid</i> abierto y en gris su conformación cerrada.	28
Fig 6. Esquema cinético de la actividad interfacial adaptado [34].	29
Fig 7. Gráfico de un CCD de 3 dimensiones más dos puntos de estrella.	31
Fig 8. Diagrama de flujo de la fase experimental.	38
Fig 9. Histograma para la variable de acidez comparado con una distribución normal.	41
Fig 10. Gráfico estandarizado de Pareto para la variable dependiente.	42
Fig 11. Histograma de los residuos del modelo comparado con la distribución normal.	43
Fig 12. Gráfico de 3 dimensiones donde se puede mostrar el comportamiento de concentración de enzima, tiempo y concentración de agua: sustrato para la obtención de FFA.	44
Fig 13. Gráfico de los efectos individuales de cada variable independiente.	45
Fig 14. Gráfico del comportamiento del costo variando los parámetros de cantidad de enzima, tiempo de reacción y relación agua: sustrato.	50
Fig 15. Graficas de costos variando un parámetro y comparando su costo con la acidez predicha.	51

## SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>RSM</b>	Metodología de Superficie de Respuesta ( <i>Response Surface Methodology</i> )
<b>CRL</b>	lipasa de <i>Candida rugosa</i>
<b>Ser</b>	Serina
<b>His</b>	Histidina
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>CCD</b>	Diseño central compuesto ( <i>Central Composite Design</i> )
<b>RBD</b>	Refinado, blanqueado y desodorizado
<b>PDB</b>	Base de datos de proteínas (Protein Data Bank)
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y drogas (Food and drugs administration)
<b>FAME</b>	Esteres metílicos de ácidos grasos (Fatty Acids Metyl Esters)
<b>ASTM</b>	Sociedad estadounidense para pruebas de materiales (American Society for Testing Materials)
<b>PND</b>	Plan Nacional de Desarrollo (2022-2026)

---

## RESUMEN

La hidrólisis de aceites consiste en formar ácidos grasos libres (FFA) y glicerina a partir del corte del enlace éster en glicéridos, los cuales son principalmente triglicéridos en el caso de aceites de origen vegetal [1], [2]; el proceso se da en medios acuosos a través de una reacción catalítica [3]. En este estudio, se hizo una hidrólisis usando una lipasa no específica obtenida a partir de la levadura *Candida rugosa* y como sustrato estearina de palma con baja cantidad de FFA, de esta manera obteniendo un compuesto de alta acidez o mayor contenido de FFA, mayor solidez y color blanco, el cual puede ser principalmente usado en la industria cosmética, jabonería y lubricantes [4]. El estudio realizó un proceso de optimización usando un diseño experimental de superficie de respuesta (RSM), usando un diseño central compuesto con puntas de estrella, usando como factores: cantidad de enzima, tiempo de reacción y cantidad de soluto/sustrato y variable respuesta la acidez medida mediante la prueba NTC 218 [5], también se determinó el punto de fusión para aceites (NTC 213) [6] antes y después de la hidrólisis para los niveles óptimos. Se obtuvo así un producto comercializable, y un modelo predictivo con los parámetros adecuados para la generación de ácidos grasos libres con un porcentaje predicho de 72.46 % y real de 75.59 %.

**Palabras clave:** Hidrólisis, ácidos grasos, estearina, lipasa, Metodología de Superficie de Respuesta, diseño central compuesto

## ABSTRACT

The hydrolysis of oils involves the formation of free fatty acids (FFA) and glycerin by breaking the ester bond in glycerides, which are mainly triglycerides in the case of vegetable oils [1], [2]. This process occurs in aqueous media through a catalytic reaction [3]. In this study, hydrolysis was carried out using a non-specific lipase obtained from the yeast *Candida rugosa*, with palm stearin containing a low amount of FFA as the substrate, thus obtaining a compound with high acidity or higher FFA content, greater solidity, and white color. This compound can be mainly used in the cosmetic, soap, and lubricant industries [4]. The study performed an optimization process using a response surface methodology (RSM) experimental design, employing a central composite design with star points, using the following factors: enzyme amount, reaction time, and solute/substrate amount, and the response variable being acidity measured by the NTC 218 test [5]. Additionally, the melting point for oils (NTC 213) [6] was determined before and after hydrolysis for the optimal levels. As a result, a marketable product and a predictive model with adequate parameters for generating free fatty acids with a predicted percentage of 72.46% and an actual percentage of 75.59% were obtained.

**Keywords:** Hydrolysis, fatty acids, stearin, lipase, response surface methodology, central composite design

## I. INTRODUCCIÓN

Colombia fue el cuarto país en producción de aceite de palma entre 2023 y 2024 en el mundo y el primero en América latina [7], con un aumento de producción en 2023 reportado de un 4,1 % [8], sin embargo, dichos aumentos de producción conllevan a riesgos medioambientales, como la deforestación, y reducción de la fauna y flora [9], [10]. En contraprestación se hace necesario aprovechar todo el material proveniente de la palma, como por ejemplo sus aguas residuales las cuales se pueden usar para hacer biogás [11], o la fibra de su fruta usada en la fabricación de papel [12], [13]. De esto se puede intuir entonces que ninguna parte del proceso de cultivo o refinamiento del aceite de palma se puede simplemente desechar y todos sus subproductos se deberían aprovechar.

Así pues, el principal producto del refinamiento del aceite de palma es la parte oleica y como subproducto se obtiene la estearina, siendo esta la parte sólida que se separa en el proceso final de refinamiento [2]. Las principales características de este subproducto es su color blanco, baja cantidad de ácidos grasos libres (FFA) y gracias a la saturación de sus enlaces de carbono, este se encuentra en un estado sólido, pero es blando y maleable a temperatura ambiente [2].

La principal alternativa de uso de este subproducto es como aditivo en la producción de margarina para darle consistencia, debido a lo costoso que puede ser la hidrogenación de esta, proceso por el cual a través de la inyección de gas de dihidrogeno con un catalizador, altas temperaturas y presiones se logra romper los enlaces dobles de carbono de los FFA o de los triglicéridos presentes en el aceite, lo cual genera un mayor nivel de enlaces saturados en el producto y la posible formación de grasas trans, se realizan formulaciones para reducir el costo del producto final gracias a la naturaleza sólida de la estearina [2] y aumentar su firmeza sin alterar sus propiedades nutricionales.

Otro uso que se le puede dar es mediante la hidrólisis, al aumentar su cantidad de FFA, se convierte en un sustrato viable para la fabricación de jabones de alta calidad, lubricantes biodegradables, productos estéticos entre otros. Este proceso de hidrólisis se da, entre otros métodos, bajo catálisis enzimática, utilizando una lipasa proveniente de la levadura *Candida rugosa*.

La obtención de FFA está supeditada a las condiciones específicas que requiere la enzima por su naturaleza biológica. Así que se realizó un diseño experimental central compuesto (CCD) y se analizó a través de una superficie de respuesta (RSM) donde se buscó el mayor valor de acidez logrado bajo la variación de parámetros como la cantidad de enzima, relación aceite/agua y tiempo de reacción, controlando variables como temperatura y agitación. Teniendo esto en cuenta se implementó un sistema de agitación, control de temperatura, y monitorización de temperatura para mantener las condiciones constantes en los experimentos. Se realizó una medición de acidez como variable respuesta. Finalmente se lograron unas condiciones apropiadas para la hidrólisis enzimática de estearina de palma que permiten maximizar la acidez, es decir, la cantidad de FFA y minimizar la cantidad de enzima usada, de modo que se obtenga un producto que pueda cumplir con las necesidades de la industria al contar con una relación de coste que sea viable económicamente para su posterior formulación y adecuación.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado (RBD) es uno de los aceites más utilizados en el mundo con un consumo de 78,06 toneladas métricas registradas en el periodo de 2023 y 2024 [14]. Además, Colombia es uno de los principales productores y refinadores de este. Esto conlleva a problemas medioambientales debido a la deforestación de las hectáreas donde se realiza el sembrado, afectando las especies autóctonas de este y su ecosistema, además de que los métodos comunes son la quema de bosques tropicales, lo cual puede liberar grandes cantidades de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, la posibilidad de derrames y por ende la contaminación de fuentes hídricas [9], [15].

Además, la actual producción de ácido palmítico, esteárico y oleico dependen principalmente de procesos de hidrólisis térmica [16], [17], lo cual consiste en el calentamiento de aceites vegetales o con perfiles con altos contenidos en estos ácidos a 180-230 °C [17] dependiendo del sustrato, con agua, agitación constante y a presiones cerca de 1000-3000 kPa, lo cual significa un gasto energético importante a nivel industrial, se estima que solo para calentar 10 toneladas de aceite de coco a temperatura ambiente a 180 °C en 6 horas se requieren 143.5 kW/h [17], o casi el equivalente al consumo energético de un mes en un hogar de Medellín en 2024 [18], sin tener en cuenta la pérdida de energía de las calderas o el sistema, además de un gasto energético adicional para mantener la presión. Lo cual contribuye a un consumo muy alto de energía para la obtención de FFA mediante el método térmico, además de la producción isómeros cis-trans lo genera problemas para la industria alimenticia por sus efectos en la salud al no poder ser digeridos por algunos mamíferos [16]. También la ocurrencia de conjugación de saturaciones y polimerizaciones, lo cual puede ser problemático en la composición final del producto ya que se modifica su perfil de ácidos y se puede generar la presencia de FFA indeseados para su aplicación, por ejemplo para la producción de ácido oleico, puede aumentar el porcentaje de insaturaciones por polimerización, generando incompatibilidades con sus valores mínimos pedidos por la food and drugs administration (FDA) [16].

Otro método alternativo es primero la saponificación, se agrega un agente básico al aceite vegetal para obtener sales de ácidos grasos (jabón) y luego con un agente ácido reducirlos a FFA [19]. Pero esto tiene implicaciones ambientales, pese a que el proceso puede pasar a temperaturas

ambiente, la problemática a un escalado industrial es el desecho de las aguas residuales, las cuales quedan con altos contenidos de sales por las reacciones de neutralización y con la implicación de tener que recurrir en costes adicionales para el buen desecho de estas aguas o la total neutralización de los agentes químicos. Lo cual implica un gasto adicional en analizar y monitorizar el agua que se desecha para que no genere daños al ambiente [20].

Otro factor para tener en cuenta es el gran gasto de fuentes no renovables que tiene el planeta, una de las principales materias primas de los lubricantes son los minerales, los cuales tienen connotaciones de contaminación de aguas y no son biodegradables [21]. Por otra parte, los lubricantes sintéticos, aunque son degradables, su producción es más costosa y son altamente tóxicos [22].

### III. JUSTIFICACIÓN

La obtención de FFA a partir de la estearina de palma a partir de una catálisis enzimática presenta una oportunidad significativa en el mercado, debido al posible uso de este por industrias como la cosmética, jabonera y lubricantes. Además de dar valor agregado por sus beneficios, tanto energéticos, como ambientales.

El uso de estearina de palma presenta ventajas y desventajas importantes. Por un lado, su cultivo tiene implicaciones medioambientales significativas a nivel mundial, debido a la quema de bosques y el desplazamiento de fauna [9]. Por otro lado, es un recurso renovable que se le puede dar un valor agregado y abrir posibilidades de uso en diversas industrias. Aprovechar la estearina de palma de manera eficiente permite darle un mejor uso a un producto común, maximizando su potencial y minimizando su impacto ambiental siguiendo las metas del plan nacional de desarrollo (PND 2022-2026) donde se establece el uso eficiente de recursos, incorporación de materiales recuperados en nuevas cadenas de valor y reducción de residuos [23].

Para la aplicación en las industrias se tiene un impacto por ejemplo en el caso de la industria cosmética los FFA sirven principalmente para aumentar sus propiedades emolientes y humectantes. En el caso de la industria jabonera, se usan principalmente para la fabricación de jabones los cuales gracias al color blanco de la estearina y su olor neutro, permite la fabricación directa de estos sin necesidad de procesos adicionales de blanqueamiento o desodorización [24], para el caso de los lubricantes se usan principalmente para generar lubricantes biodegradables, un mercado en crecimiento debido a las preocupaciones medio ambientales, lo cual se incentiva en el PND, con la inclusión de nuevos materiales biodegradables y reducir la dependencia de los insumos químicos [23].

Inicialmente la optimización por método de RSM, permite no solo identificar las condiciones ideales de obtención de FFA, sino que también implica una reducción de costos en el proceso. Adicionalmente se da el uso de un método innovador y de bajo costo comparado con métodos tradicionales, que permite ser usado de punto guía para la inclusión de otros sustratos en procesos de hidrólisis y así abrir las puertas de estas materias primas a otras industrias y darles un valor

agregado, algo necesario para apoyar al plan de sostenibilidad de la siembra de palma en Colombia [25] apoyando este sector dándole un valor adicional a sus subproductos y fortaleciendo el crecimiento verde y la economía circular propuesto en el PND [23].

El proceso estudiado presenta un impacto ambiental al reducir la energía necesaria para la reacción, de esta manera siguiendo los alineamientos del plan energético nacional (PEN 2030-2050) donde se establece el adoptar nuevas tecnologías y eficacia energética para el uso eficiente de los recursos energéticos [26], a través de la hidrólisis enzimática la cual comparada con otros métodos que se requiere de altas temperaturas, lo cual usualmente se consigue por la quema de combustibles fósiles, y en el caso de compararla con la hidrólisis térmica se requiere un 27 % de la energía utilizada por este medio para el calentamiento del sustrato [17].

Además de no necesitar ningún otro aditivo y ser biodegradable lo cual implica que los residuos de este proceso no contaminan el agua, lo que reduce la huella medio ambiental para la generación de FFA. Y en el caso de lubricantes los cuales son principalmente elaborados a base de minerales o petróleo, ambas fuentes no renovables, a través del Eu Ecolabel [27], donde se establecen los objetivos de disminución de polución y la incentivación de las empresas en el desarrollo de productos biodegradables para reducir la contaminación causada por lubricantes a base de minerales [28] y en el PND con el fin de reducir la dependencia de los combustibles fósiles y la incentivación del uso de alternativas verdes [23].

Así, este producto se alinea con los parámetros de biodegradabilidad y disminución de contaminación, tanto en una reducción de coste energético, como de uso de reactivos que puedan contaminar, reducción de la dependencia de productos químicos, y la elaboración de un producto final biodegradable por parte de las compañías que requieran de esta materia prima en su formulación.

## IV. OBJETIVOS

### *A. Objetivo general*

Obtener un producto comercializable a partir de la estearina de palma mediante la determinación de condiciones viables del proceso de hidrólisis enzimática.

### *B. Objetivos específicos*

- Explorar el efecto de la variación de parámetros como concentración de enzima, relación agua/sustrato y tiempo de reacción del proceso de hidrólisis de estearina de palma.
- Determinar las condiciones óptimas de concentración de enzima, relación agua/sustrato y tiempo de reacción del proceso de hidrólisis de estearina de palma.
- Evaluar la viabilidad económica del proceso en los parámetros óptimos, con precios del mercado actual.
- Examinar el producto final en contraste con muestras comerciales, considerando los parámetros de acidez y punto de fusión.

---

## V. MARCO TEÓRICO

### A. Aceite de palma

El aceite de palma es extraído de la planta africana *Elaeis guineensis*, la cual produce frutos de color naranja oscuro que luego de 5 meses de maduración se cosechan para luego ser esterilizados, para desnaturalizar la enzimas naturales que aumentarían el desdoblamiento de esteres de ácidos grasos en ácidos grasos libres, seguido a esto se desgranar, para en consiguiente separar la pulpa de la nuez y extraer el aceite que este contiene, esto usando presión de prensas, luego se decanta para eliminar aguas, arenas o fibra presente y se centrifuga para eliminar el resto de impurezas. Obteniendo así crudo de aceite de palma [2], [9], [24].

El crudo se encuentra principalmente compuesto por triglicéridos (98 w/w%), y usualmente tiene una acidez baja (<5 w/w%) [2] luego este producto pasa a ser refinado debido a su color rojizo producido principalmente por el  $\beta$ -caroteno, para lograr una mejor apariencia del aceite y la eliminación de olores. Este pasa por un proceso de secado, desgomado, blanqueamiento y desodorización, obteniendo así el aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado (RBD) el cual se fracciona en oleína y estearina [2], [9], [24]. Estas dos fracciones se diferencian por el grado de insaturaciones presentes, siendo la estearina la que presenta mayor saturación, lo cual le confiere una textura sólida a temperatura ambiente [2].

La estearina de palma al ser un subproducto del aceite de palma comparte cualidades en términos de ácidos grasos [2], teniendo en su composición principalmente, ácidos grasos saturados (40-48%), siendo el más presente el ácido palmítico (49,3-68%), en forma de tripalmitina triglicérido que se compone por 3 moléculas de ácido palmítico y glicerina [1], y de ácidos grasos insaturados (37-45%), con el oleico como mayor representante (24-34%) [1]. En específico se encuentra el perfil de ácidos grasos encontrado por Podchong *et al* [29] en la TABLA I.

TABLA I.  
PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE ESTEARINA ADAPTADO DE PODCHONG *ET AL* [29].

Ácido graso	Contenido (%)
Laurico (C <sub>12</sub> )	0,2
Mirístico (C <sub>14</sub> )	1
Palmítico (C <sub>16</sub> )	53
Estearico (C <sub>18</sub> )	4,7
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	27,9
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	6,4
Linolénico (C <sub>18:3</sub> )	0,08
Alquídico (C <sub>20</sub> )	0,3
Behénico (C <sub>22</sub> )	0,05
Lignocérico (C <sub>24</sub> )	0,05

### B. Hidrólisis de aceites

Uno de los métodos más comunes de hidrólisis química es la adición de un catalizador básico a altas temperaturas (150 °C-250 °C), altas presiones (50 bar) y tiempos de reacción de 2-4 horas [30], [31]. Esto posiblemente pardea el aceite dependiendo de su origen, debido a las altas temperaturas [32], lo que implica un proceso de blanqueamiento adicional, usualmente dado por una columna de vapor de agua y el uso de carbón activado [33]. Otra alternativa de hidrólisis es el uso de enzimas en este caso lipasas, que gracias a su carácter biológico reaccionan a bajas temperaturas (30°C – 60°C), con tiempos de reacción promedio de 5–8 horas y presión atmosférica. Además de que estas al ser biodegradables no contaminan las fuentes acuosas y facilitan su posterior tratamiento para su reúso.

Por otra parte, la hidrólisis en aceites se puede realizar de dos maneras, directa o indirectamente. El método directo consiste en reaccionar los esteres de ácidos grasos que son en su mayoría triglicéridos (3 ácidos grasos unidos por enlaces de éster a una molécula de glicerina), mediante el mecanismo de reacción de hidrolisis catalizado por lipasas [24]. Este enlace éster es roto por la enzima y permite la adición de 3 moléculas de agua para formar los ácidos grasos; en este caso al ser un subproducto del aceite de palma estos en su mayoría serán palmíticos y oleicos [1], además de una molécula de glicerina. Cabe resaltar que en el caso de que el sustrato contenga mono o diglicéridos se verán afectados de la misma manera por el proceso enzimático, solo que en este caso se gastara una o dos moléculas de agua, respectivamente. Esta reacción se evidencia en la reacción de hidrolisis para ácidos grasos (Fig 1).

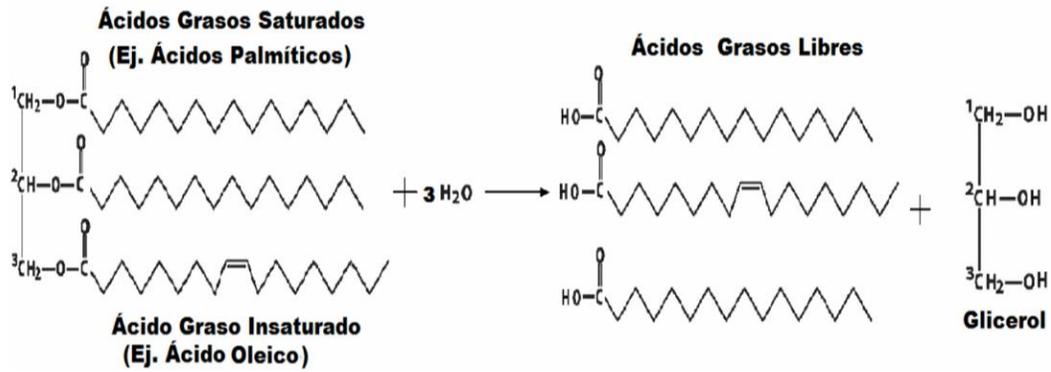


Fig 1. Hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos libres[24].

Adicionalmente, las lipasas no específicas funcionan mediante un ataque nucleofílico sobre un átomo de carbono del grupo carbonilo del glicerol desde el medio acuoso al no acuoso, seguido a esto queda un diglicérido, un alcohol y el complejo acil-enzima, este complejo acil-enzima puede ser atacado por una molécula de agua, un alcohol o un diglicérido, en cada caso dando resultado un FFA, éster o un triglicérido respectivamente [30] como se puede observar en el esquema de la reacción de hidrólisis catalizado por una lipasa (Fig 2). Asimismo, se puede denotar que, en teoría, a una mayor concentración de agua, la probabilidad de que la reacción forme FFA y no otros sustratos, es mayor, además de facilitar el contacto entre el medio acuoso y el oleico.

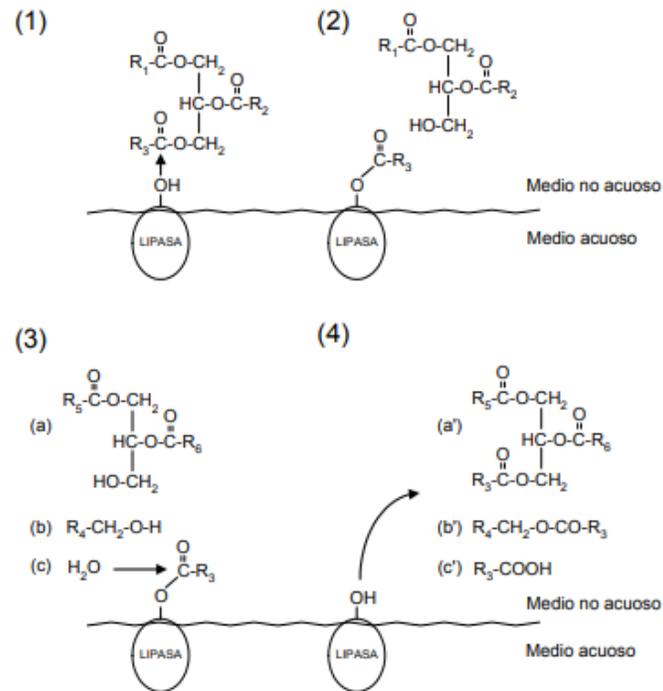


Fig 2. Etapas de la hidrólisis catalizada mediante lipasas [30].

Sin embargo, las enzimas al ser de una naturaleza biológica necesitan condiciones específicas para reaccionar. Una de ellas es que las lipasas son hidrosolubles y solo actúan en la interfase entre el agua con el aceite, también dependen de que se supere el umbral de activación interfacial [34], por ende se requiere una agitación constante y uniforme en la reacción para facilitar la catálisis. La temperatura de la reacción debe ser baja comparada con otros procesos químicos, debido a la propia naturaleza de estas y la probabilidad de su desnaturalización [35], usualmente se trata de temperaturas de 30 °C a 50°C [34]. Por ende, la reacción está supeditada a diferentes factores, como el grado de contacto con el agua, catalizador usado, temperatura, presión etc. Pero los más representativos en este caso al usar enzimas, son:

#### *a. Temperatura*

Es importante debido a que afecta directamente la interacción de enzima con el sustrato, sin embargo, se debe tener en consideración los rangos de eficiencia de la enzima, la cual a altas temperaturas puede ser desnaturalizada [35]. Incluso en las temperaturas recomendadas puede no funcionar como se espera [36], en este caso, también la temperatura afecta el grado de emulsión

que tiene el agua y la grasa, lo ideal entonces serían altas temperaturas que permitan aumentar la solubilidad del agua y la fase de grasa [24], pero, como se menciona anteriormente, dichas altas temperaturas pueden ser perjudiciales para la propia enzima, así que se recomienda establecer un rango de temperatura a base de la información suministrada por el vendedor [37] y en base con experimentos previos usando la misma enzima [30], en el caso de grasas sólidas a temperatura ambiente, también se tiene que considerar su punto de fusión para de esta manera obtener una correcta acción enzimática.

*b. Concentración agua/aceite*

Teóricamente es mejor las relaciones altas de agua/aceite en este tipo de reacciones, al menos en lo propuesto por la vía química donde se ha encontrado mejores resultados usando una relación 1:1 o 2:1 de agua/aceite [38], aunque en algunos casos específicos dichas concentraciones elevadas retrasan la reacción al generar una emulsión más duradera y limitando el contacto con la enzima [24], [37].

*c. Concentración enzima/sustrato*

De manera similar a la concentración agua/aceite se encuentra que a mayores cantidades de enzima puede producir un mejor resultado o tiempos de hidrólisis reducidos [30], [36], [37] pero entra en consideración el costo de la enzima. Pese a esto también se encuentran reportes donde el aumento de uso de enzima genera peores resultados [3], [37], esto es debido a la inactivación de la enzima con respecto al tiempo, al verse reducida la cantidad de ésteres de ácidos grasos disponibles.

*d. Otros factores para tener en cuenta*

Se ha verificado que la velocidad de agitación y la forma del cabezal de agitación puede tener un mayor impacto en cuanto a la producción de FFA, encontrando que a mayores velocidades de agitación mayor producción [24], debido a que esto favorece la interacción de la interfase lo cual mejora la superficie de contacto de la enzima en su medio acuoso con el aceite. Sin embargo, se recomienda no pasar 200 rpm debido a que esto puede favorecer mayormente la emulsión y generar problemas con dicho contacto [30], [33].

De manera similar, otro factor importante para tener en cuenta es la influencia del pH en la solución, esto debido a la naturaleza biológica de las enzimas y que usualmente las lipasas son alcalinas, teniendo mejor rendimiento en valores de pH más elevados usualmente cerca del 7 u 8, además estos valores de pH de por si ayudan con la reacción debido a lo mencionado anteriormente para las vías químicas de desdoblamiento de triglicéridos [24], [30], [33].

### *C. Características de la lipasa de Candida rugosa*

#### *a. Lipasas.*

Las lipasas, o triacilglicerol éster hidrolasas, las cuales poseen capacidad de la hidrólisis de triglicéridos, se encuentran en una gran variedad de organismos, como algunos anfibios y peces, pero principalmente mamíferos, algunas especies de hongos y levaduras [39], se usan principalmente para la formación de FFA a partir de triglicéridos. Ya que los FFA se requieren para su posterior oxidación en el ciclo de Krebs y la formación de ATP [40], y su posterior uso como fuente de energía.

Como se menciona anteriormente estas enzimas se encuentran principalmente en mamíferos, sin embargo, en de la industria alimenticia dichas fuentes presentan limitaciones ya que pueden contener virus u hormonas, aparte de la poca cantidad de lipasa que se puede producir a nivel industrial y el poco control sobre esta [41]. Por dicha razón se encuentran comercialmente enzimas con orígenes en algas o microorganismos como levaduras y otros hongos, en los cuales se puede controlar la producción de lipasa a través de modificaciones genéticas o su fuente de carbono [42].

#### *b. Origen*

La *Candida rugosa* es una levadura de la división Ascomycota la cual tiende a encontrarse en infecciones por mastitis en vacas y en pacientes con traumas críticos, sobre todo en mayor frecuencia en las regiones de Latinoamérica [43], estas se reproducen por medio de ascosporas endógenas las cuales producen esporas en “sacos” llamados ascos; estas levaduras son asexuales [44].

De esta levadura se extrae la lipasa de *C. rugosa* (CRL), por medio de un proceso de fermentación en el cual la elección de la fuente de carbono es especial para el crecimiento de esta

y la producción de lipasa, ya que, dependiendo de la fuente puede variar el comportamiento, por ejemplo: crecimiento de la levadura sin producción de lipasa, crecimiento y producción limitados o no crecimiento ni producción. Usualmente se usan como inductores FFA debido a su bajo precio comparado con otros métodos como hexadecano y otros ácidos carboxílicos [42]. Debido a la complejidad del proceso de fermentación en términos biológicos, no existe una cadena de expresión específica para la producción de CRL por lo cual, dependiendo de la fuente de carbono se puede obtener distintos perfiles isoenzimáticos, los cuales se dividen en Lip1, Lip2, Lip3. Además, se puede presentar cantidades de proteínas residuales en el proceso de separación y la presencia de lactasa en el producto final, las cuales pueden funcionar como inhibidores en los procesos subyacentes a su especificidad [41], [42], [45].

Teniendo en cuenta el perfil isoenzimático de las muestras comerciales, se puede observar que en el estudio realizado por Domínguez de María *et al* [42], hay una mayor presencia de Lip1. Esto sugiere que la producción de estas muestras comerciales se realiza bajo condiciones de altos flujos de alimentación para la *C. rugosa*, lo cual concuerda con las necesidades de la industria de altos niveles de producción en cortos periodos de tiempo.

Este perfil en particular, presenta una clara ventaja comparando con la Lip2, Lip3 y Lip4, ya que según los estudios de Rúa *et al* [46] la Lip1 es más hidrofóbica que sus otros complejos isoenzimáticos, a excepción de la Lip4, solo que en este caso es de mayor dificultad su obtención por métodos industriales debido al alto costo de su fuente de carbono (ácido oleico) y proceso de purificación [42].

### *c. Estructura química*

Actualmente se conocen varias estructuras tridimensionales de las lipasas, obtenidas de animales tales como cerdos, perros, ratas y seres humanos, se ha encontrado una similitud en los mamíferos debido a su forma y sus dominios de activación, pese a esto se pueden identificar 3 zonas fundamentales en la estructura de estas.

i. Plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa

Este es uno de los principales diferenciadores de las lipasas, ya que dependiendo de su origen pueden cambiar el tamaño de plegamientos, curvaturas de láminas y su actividad catalítica, sin embargo se mantiene la misma estructura básica la cual consiste en 8 cadenas  $\beta$  conectadas a por hélices  $\alpha$ , las cuales empaquetan a ambos lados la hoja  $\beta$  [34], [41].

ii. Triada catalítica

Constituida por los aminoácidos; serina (Ser), histidina (His) y ácido aspártico (Asp). La cual se presenta en todas las lipasas, y su actividad depende principalmente de la conexión de la Ser con agentes inhibidores.

iii. Centro activo

Este es formado por el intermediario de hidrogeno el cual dobla los aminoácidos hacia dentro de la enzima, lo cual gracias a las interacciones moleculares y sobre todo la solubilidad de esta, la protege de la interacción con sustratos, este cambio de estado se conoce como “lid” o tapa [30], [34], [41]. Estas estructuras se pueden evidenciar claramente en la estructura tridimensional genérica de las lipasas (Fig 3) y en la forma tridimensional de una CRL similar a la de este estudio (Fig 4).

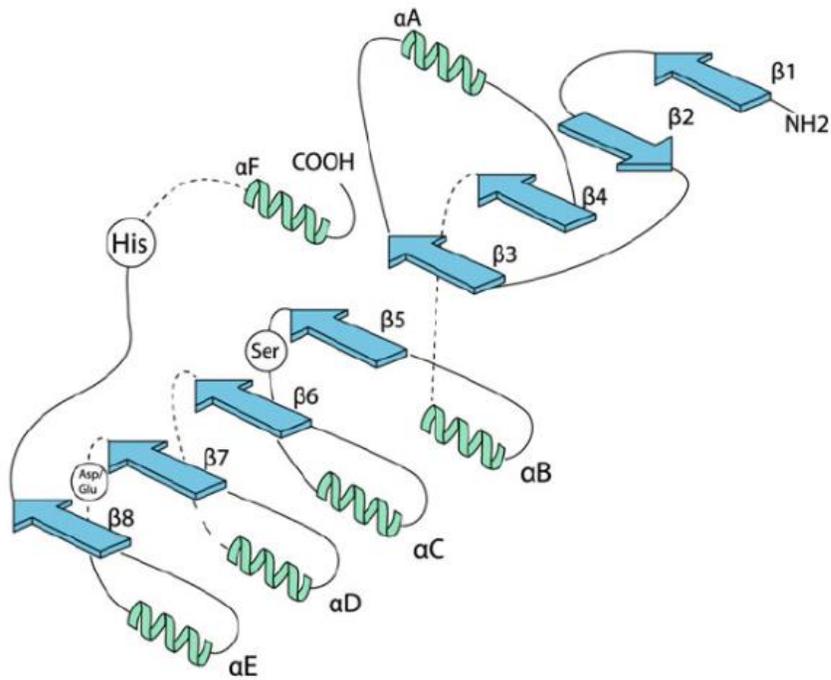


Fig 3. Estructura tridimensional y genérica de la lipasa [41].

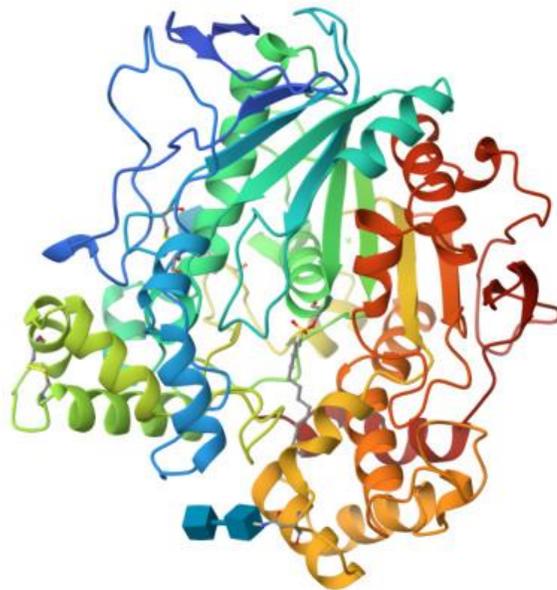


Fig 4. Estructura real de la 1LPO una CRL [47].

*d. Especificidad de la enzima*

Las lipasas pueden ser específicas dependiendo de su estructura, la naturaleza del sustrato y la unión de la enzima con este, estas se dividen en:

i. Regioespecificidad

Es la capacidad de la enzima por discriminar lugares del triglicérido, estas se definen como 1 y 3 siendo las posiciones exteriores (ver Fig 1) y 2 como la posición interna, existiendo 2 grupos las sn-1,2 y sn-2, de estas las menos comunes de encontrar son las sn-2 [30], [34], [41], así existen enzimas que son no específicas como la CRL, las cuales no tienen una prelación por alguna de estos dos sectores mencionados y atacan aleatoriamente los enlaces éster de los triglicéridos.

ii. Acilespecificidad

Se define como la selectividad con respecto al tamaño de las cadenas de FFA que componen el triglicérido, donde estas prefieren atacar los grupos funcionales más grandes, o más cortos. Esto dado por la estructura o conformaciones que pueda tener su composición de plegamiento  $\alpha/\beta$ , ya que para algunas estructuras con insaturaciones o tamaños les será más fácil entrar en el centro activo [30], [41].

iii. Tipospecificidad

Esta es la capacidad que tienen las enzimas para diferenciar y tener una preferencia por mono, di o triglicéridos. Cabe resaltar que la Lip1 tiene preferencia por mono y diglicéridos, y muestra nula actividad con respecto a triglicéridos [41]. Como se menciona anteriormente las enzimas comerciales a partir de la *C. rugosa* contienen mayormente Lip1 [42], lo cual puede ser problemático ya que se debe dar un tiempo de reacción adicional para romper los triglicéridos y que los resultados de esta reacción puedan ser procesadas por las Lip1.

#### iv. Estereoespecificidad

Las enzimas tienen la capacidad de reconocer o de ser selectivas en caso de encontrarse con una molécula quiral, las cuales pueden diferir entre la posición sn-1 y sn-3 y su actividad puede variar de 0,1 a 1 de selectividad de una porción de estas [41].

#### D. Mecanismo de reacción enzimática

Por lo mencionado anteriormente se sabe que la molécula es altamente hidrofílica, así que para poder interactuar con la parte hidrofóbica requiere de un mecanismo que, primero exponga su centro activo compuesto por aminoácidos a la parte hidrofóbica. Para ello entonces la enzima cuenta con varias hélices  $\alpha$ , las cuales tienen la característica de poder moverse en presencia de una interfase lipídica [41]. Dicho comportamiento puede ser observado en el esquema tridimensional donde se muestra la conformación de un dominio de tapa (*lid*) abierto y cerrado en la 1CRL (Fig 5), tomado de la base de datos de proteínas (PDB) [48], y cabe resaltar que en la reacción de hidrólisis catalizada por lipasas (Fig 2), la estructura química que interactúa con la parte hidrofóbica es el centro activo con su *lid* abierto.

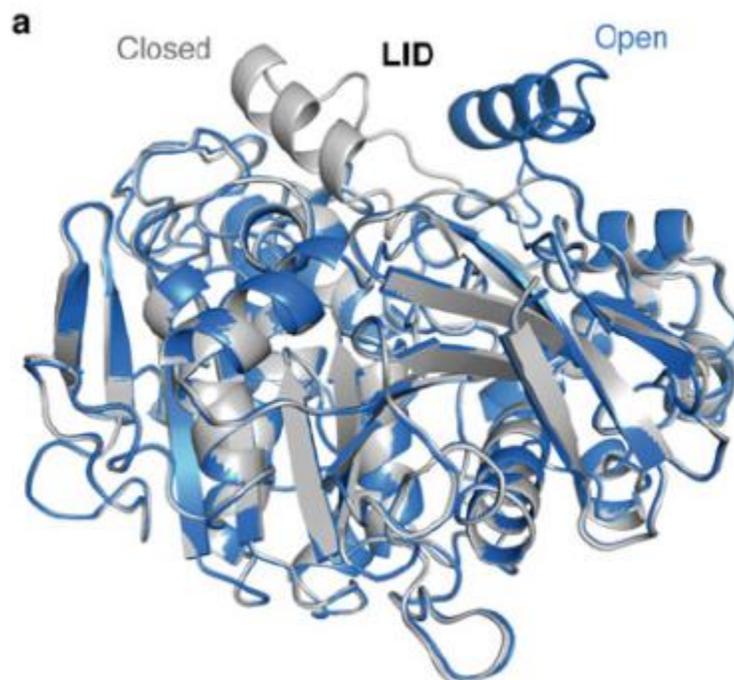


Fig 5. PDB 1CRL, en azul esta su conformación con *lid* abierto y en gris su conformación cerrada.

Nota. Fuente Casas-Godoy *et al* [41] y PDB 1CRL [48].

Este efecto aumenta respecto a la presencia de micelas en una emulsión y se ha demostrado por estudios como el de García [30], Molano *et al* [3] y Serri *et al* [33] donde la velocidad de agitación demuestra un cambio sigmoideal en la actividad de la lipasa. Dicha relación puede ser observada en el esquema cinético de la actividad interfacial (Fig 6), donde  $V$  es la velocidad de la reacción catalizada, y  $S$  es la concentración el sustrato. Las líneas discontinuas es la concentración micelar crítica, punto en donde se tiene una mayor velocidad debido s la formación de micelios por la agitación de la emulsión facilitando su interacción con la interfase [34].

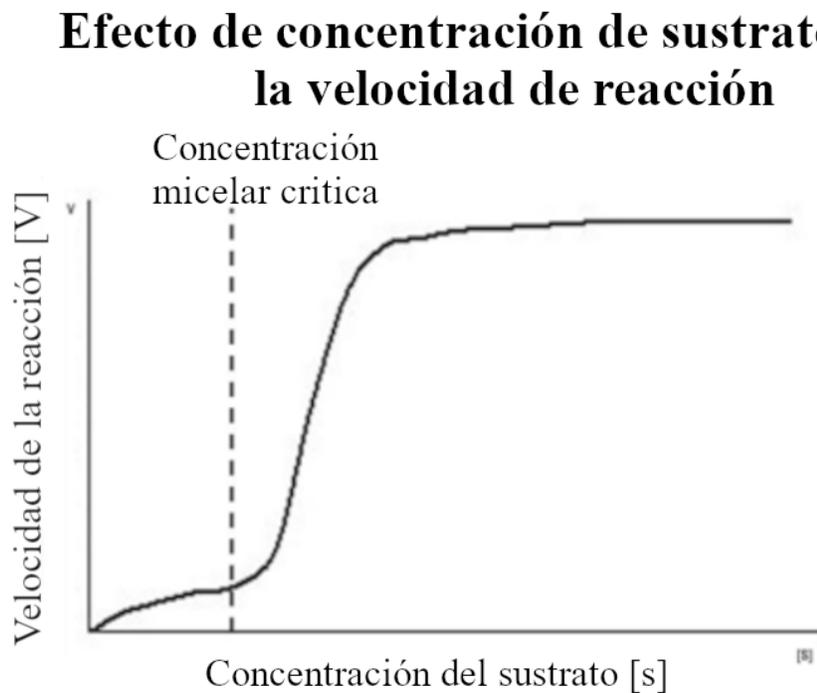


Fig 6. Esquema cinético de la actividad interfacial adaptado [34].

#### E. Estadística descriptiva.

##### a. Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta o (RSM), consiste en tres principales objetivos, establecer una relación de valores aproximados para un modelo basado en niveles de una variable independiente ( $X_1, X_2, X_3 \dots, X_k$ ) y una dependiente ( $y$ ), demostrar a través de una prueba de

hipótesis que estos niveles tienen una significancia para  $y$ , determinar el valor donde  $y$  sea máxima en una determinada región de interés [49], [50].

Para esto se debe realizar un diseño experimental con una repetitividad  $n$ , donde en cada corrida experimental se evalúa la variable dependiente ( $y$ ), esto en la región de interés delimitada por valores máximos y mínimos de los niveles, la finalidad de dichas variaciones es construir un espacio  $R^n$ , adicional a esto se pueden incluir puntos de estrella, valores con la misma varianza de los niveles especificados con el fin de que estos sean valores máximos o mínimos para evaluar el efecto de estos niveles extremos en la respuesta y facilitar el ajuste del modelo matemático [51].

A parte de esto, existen varios tipos de diseños, como el rotatable, de precisión uniforme y ortogonal, en este último caso, se parte de una matriz ortogonal, la cual permite que los niveles no estén correlacionados debido a la ortogonalidad de la matriz, aunque cabe considerar que se debe probar que los errores de los elementos tienen una distribución normal para probar que son estocásticamente independientes [49].

En estos casos también se considera la robustez del modelo, la cual trata de generar un modelo ajustado, el cual no se vea afectado por los errores de la parte experimental del proceso, y esta pueda ser representativa en los resultados finales de distribución del error.

Otra consideración del diseño es el grado del modelo, en este caso existe de primer o segundo orden, de múltiple respuesta, entre otros. En específico en los modelos de segundo orden está el diseño central compuesto (CCD), este es similar a un modelo  $2^k$ , donde dependerá de un  $\alpha$ , el cual es la distancia del centro del modelo hasta las aristas de este y el  $k$  definido como el número de replicas para el experimento [49], [50]. Para el caso particular de un modelo en 3 dimensiones se tiene el gráfico de un diseño en 3 dimensiones de un CCD (Fig 7).

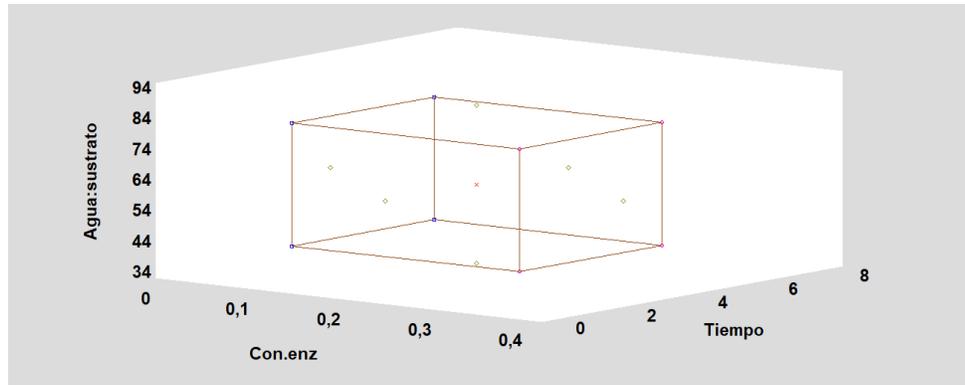


Fig 7. Gráfico de un CCD de 3 dimensiones más dos puntos de estrella.

De esta forma podemos definir un experimento CCD más dos puntos de estrella donde cada nivel tendrá un peso en el modelo final ajustado ecuación 1.

$$y = x_1b_1 + x_2b_2 \dots + x_kb_k \quad (1)$$

Donde  $x_1, x_2 \dots, x_3$  son las variables independientes y  $b_1, b_2 \dots, b_k$  los pesos de dichas variables en el modelo. Además de esto se incluyen combinaciones lineales de dichas variables con un peso diferente para mejorar el ajuste del modelo.

Así tras de obtener una función que pueda modelar el comportamiento de la variable dependiente, se puede realizar un proceso de optimización tras la derivada de este, en los múltiples niveles para así establecer unos valores óptimos en este modelo y establecer un comportamiento de cada variable independiente.

#### *b. Veracidad del modelo*

Para que el modelo sea confiable, se parte de unas suposiciones específicas de los datos obtenidos las cuales según Emerson [52] son:

1. Que los datos sean continuos y estén en un rango establecido
2. La distribución de los datos debe ser normal.
3. La varianza de las poblaciones que provienen las muestras es igual.

4. Los datos deben ser independientes de los demás grupos, y las muestras se obtuvieron de manera aleatoria.

Adicional a esto se deben probar las suposiciones de la RSM las cuales define Dean *et al* [53] como:

1. Los residuos deben cumplir con una distribución normal.
2. La varianza de los residuos debe ser igual en cada variable independiente.

Así, para normalidad existen varios métodos para probar dicha hipótesis, desde correlaciones visuales por histogramas o graficas de caja y bigotes, hasta pruebas robustas como la de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, CVM, AD entre otras [54]. Para el caso de pruebas empíricas se recomienda el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov [55]. Donde esta se toma el valor de la media  $\mu$  y la desviación estándar  $\sigma$ , y lo compara cumulativamente a través de los datos de izquierda a derecha siendo esta una prueba de dos lados. Su resultado se interpreta si el valor p de resultado es superior a 0.05 rechaza la hipótesis nula, la cual establece que la distribución no es normal [55].

Ahora para evaluar la varianza de dos poblaciones, o la homocedasticidad de dos grupos, se tienen pruebas como de Bartlett, F de proporción de varianza de logaritmos, logaritmos, y Levene. En este caso se recomienda la prueba de Levene gracias a su robustez comparada con las otras pruebas [56].

*c. Métricas del modelo obtenido.*

Luego de obtenido el modelo, se debe comparar con los datos originales y mediante métricas cuantitativas para así establecer una similitud entre el fenómeno natural y los datos predichos. Para esto existen varias métricas como lo pueden ser el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), el cual varia de 0 a 1 siendo 1 un ajuste perfecto. Error medio absoluto (MAE), MAE relativo, error cuadrado medio (MSE), raíz de MSE (RSME), RSME estandarizado (SRSME) entre otros. Estos pueden variar de 0 hasta infinito. Uno de los más usados es la prueba  $R^2$ , aunque cabe resaltar solo en el caso que tanto la gráfica predicha como la observada tengan el mismo comportamiento [57],

además que como tienen un rango establecido se puede comparar fácilmente, adicional a esto se puede realizar una prueba MAE, aunque estas son extremadamente sensibles al error y al no tener un rango definido su inferencia es subjetiva a su bajo valor y depende mucho del contexto del estudio, entonces en casos con un alto porcentaje de error en los datos observados no se recomiendan como una métrica ideal [57]. También se tiene la prueba de Durbin-Watson la cual describe una relación lineal de los residuos, en esta los valores que converjan o sean cercanos a 2 significa que dichos residuos son aleatorios, si es mayor a este indican una correlación positiva y si es negativo una correlación negativa, este hasta 0 y 4 donde sus correlaciones son perfectas [58], también se puede considerar un valor p donde si este valor es superior al 5 % indica una no correlación.

## VI. ANTECEDENTES

Según el trabajo de Riveros [24], quien utilizó una enzima de origen similar a la de este estudio, se realizó un estudio similar al propuesto variando factores como la velocidad de agitación, el porcentaje de blanqueamiento y la cantidad de enzima. Los resultados mostraron que la velocidad de agitación tuvo un mayor efecto en comparación con el porcentaje de lipasa y el porcentaje de blanqueamiento, respectivamente, usando aceite de palma como sustrato. Estas pruebas se realizaron variando solo los parámetros mencionados, mientras que se mantuvieron constantes la temperatura, la relación de reactivos, el pH y la presión. Aunque en este caso se utilizó un porcentaje máximo de enzima del 20% con respecto al sustrato inicial, lo cual, a escala industrial, podría resultar en altos costos de producción, al igual que una agitación máxima de 370 rpm.

De manera similar el estudio de Serri *et al* [33], se trabaja con una enzima de origen similar (*C. rugosa*), en el artículo se trabaja con aceite de palma de cocina, se realiza una variación de pH, temperatura, velocidad de agitación, concentración de enzima y relación de agua/aceite, dando como resultados una estabilización de la conversión con respecto al tiempo, un descenso de la actividad enzimática a pH superiores e inferiores de 7.5 debido a la desnaturalización de esta, de manera similar a temperatura un descenso marcado luego de 45°C por el mismo fenómeno. También se encuentra que la velocidad apropiada de agitación es de 200 rpm, teniendo un descenso y estabilización a velocidades más altas. Por otra parte, con respecto a la concentración de enzima se observa una estabilización después de 7.14 kLU/ml, esto debido a la saturación de la enzima en la zona de interfase, lo cual no favorece a la conversión después de este punto. A diferencia de la concentración de agua/aceite, donde este decrece entre menor cantidad de agua, debido a la saturación de enzima diluida. Sin embargo, cabe resaltar que a mayores cantidades de esta no demuestran una mejoría en el proceso donde en el caso de una relación de 3:1 da como resultado 90% de conversión en cambio con 8:1 se reduce a 72%.

Por otra parte en el trabajo de García [30], donde se buscaba el uso lipasas para la industria de detergentes, se establecen varios sustratos en este caso, cadenas de triglicéridos específicas

como la trioleína y la tributirina, en lapsos de 10 minutos de reacción, variando parámetros como concentración de enzima, proveedor de enzima (Lipolase 100, LipoPrime T50 y Novozym 388), método de agitación estudiando a fondo el tamaño de gota, influencia de pH, temperatura, y evaluando su generación de FFA en micro equivalentes. Para las lipasas del estudio, se encuentra un mayor nivel de obtención de FFA por la variación de la cantidad de enzima comparado con otras variables, con un valor máximo de 100 micro equivalentes, seguidamente mostrando una ligera mejoría en la activación a 50 °C para ambos sustratos mencionados anteriormente, obteniendo en el mejor de los casos un valor cercano a los 25 micro equivalentes, adicionalmente se demuestra un cambio respecto al valor de pH, en el caso de la tributirina con el uso de la Lipolase 100 se tienen mejores resultados en pH de 10.5, en cambio con el uso de trioleína se encuentra en un pH de 7.5. Cabe resaltar que las variables de agitación son de 13000 rpm durante 1 minuto, o en un dispositivo de ultrasonido y luego evaluado en el tiempo.

## VII. METODOLOGÍA

El enfoque principal fue cuantitativo, la variable dependiente es el porcentaje de acidez logrado por la reacción bajo los parámetros establecidos, con el fin de optimizar los costos de producción. Así lo primero fue establecer los factores y niveles del diseño experimental con base en pruebas exploratorias con resultados similares a los deseados.

### A. Diseño del experimento

Para ello se realizó un diseño central compuesto (CCD) con 2 puntos de estrella y su centro en un punto aleatorio, usando el software Statgraphics 19, teniendo como factores la relación agua: aceite, la concentración de enzima y el tiempo de reacción. La variable respuesta fue el porcentaje de acidez del aceite. La TABLA II presenta los niveles de factores definidos.

TABLA II.  
NIVELES ESTABLECIDOS PARA EL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN

Variable independiente	Valor mínimo	Valor máximo	Centro	Punto de estrella (máximo)	Punto de estrella (mínimo)
Relación agua: aceite (w/w%)	40 %	80 %	60 %	85,74 %	34,25 %
Concentración de enzima (w/w%)	0,05 %	0,3 %	0,175 %	0,335 %	0,014 %
Tiempo de reacción (horas)	2	6	4	6,574	1,426

El diseño anterior se realizó por triplicado lo que generó 48 corridas experimentales en un orden aleatorio, por ende, se realizó un cronograma específico con los días de trabajo tiempos de reacción para estimar la duración de la fase experimental.

Este diseño contó con un intervalo de confianza del 95 % y se estimó un error total de 38 grados de libertad, y un error puro de 3 grados de libertad.

### *B. Fase experimental*

Como parámetros constantes se tuvo la agitación, la cual se mantuvo a 234 rpm usando un motor de 1,6 caballos de fuerza conectado a un variador; la estearina de palma la cual contó con una acidez inicial de 1,17 %, humedad de 0 % y punto de fusión de 48 °C; la temperatura se fijó en 50 °C, la cual es medido constantemente por una termocupla (ver *Anexo B*). Se realizaron las corridas experimentales a presión atmosférica, sin modificar el valor de pH, ni la forma del agitador o su velocidad.

El motor tenía un aspa en forma de estrella, el cual se utilizó para agitar el contenido de estearina de palma dispuesto en un beaker de boro silicato de 1 L, este se encontraba sumergido en un baño de aceite contenido en un recipiente de acero inoxidable encima de una estufa. Esta era controlada por un relé de estado sólido, el cual estaba dirigido por un microcontrolador conectado a una termocupla sumergida en el baño de aceite para mantener la temperatura deseada.

Como sustrato se tuvo estearina comercial, el agua usada fue purificada por filtro, todo se pesó antes de la prueba en una balanza con una precisión de  $\pm 1$  g, se tomaron los valores de estearina la cual se establece en 300 gr para cada prueba, y a partir de ella se calculó la cantidad de agua y de enzima a usar dependiendo de la prueba, finalmente se pesó el beaker con el contenido de agua y estearina para de esta manera mantener la cantidad de agua durante la prueba por la posible evaporación de esta. Dicha solución se calentó con agitación constante hasta alcanzar los 50°C.

Para pesar la enzima en este caso se usó una balanza con una precisión de  $\pm 0,01$  g, esta se disolvió en 20 ml de agua filtrada y se incubó a 40 °C durante 10 minutos antes de su uso. Cuando la solución de prueba alcanzó los 50 °C se agregó la enzima y se registró el tiempo de inicio de la prueba.

La fase experimental se puede contemplar gráficamente en el diagrama de flujo observado correspondiente Fig 8.

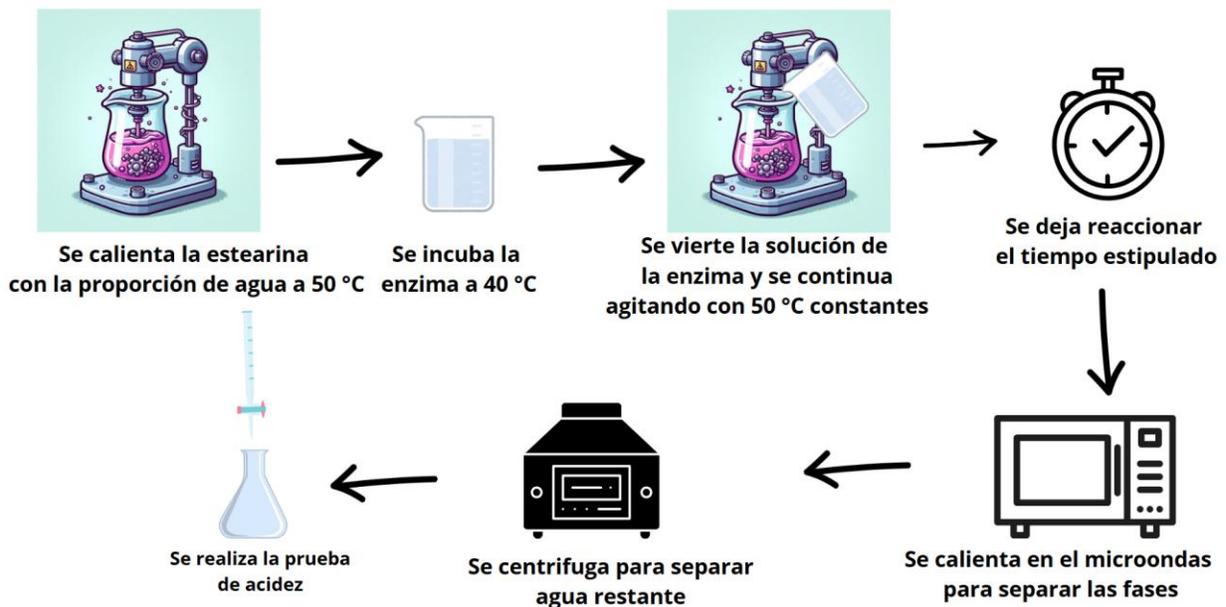


Fig 8. Diagrama de flujo de la fase experimental.

#### a. Medición de acidez

Al finalizar el tiempo estipulado se retiró una alícuota de la solución del beaker de 1 L y se transfirió a uno de 50 mL. Esta solución se calentó en un microondas a media potencia por 20 segundos para inactivar la enzima, luego se centrifugó por 1 minuto o hasta que se observara una clara separación de agua y aceite, se tomó una porción del aceite superior y se pesó, luego se siguió las instrucciones de la norma NTC 218 [5], se agregó 10 g de alcohol al 98 % v/v marca ANTIOQUEÑA DE QUIMICOS y se calentó en el microondas hasta observar la ebullición de este. Se agitó muy bien para homogenizar la mezcla y se agregaron 4 gotas de fenolftaleína (preparada al 10 g/L), agitando vigorosamente. Se anotó el nivel actual de la bureta de 50 ml, la cual contenía una solución de 0,1 N de NaOH de marca MERK. Este se agregó con agitación constante hasta que un color rosado pálido perdurara durante 30 segundos.

Para el cálculo de acidez (Ac) se usó la ecuación (1):

$$Ac = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * 256,43}{10 * p} \quad (1)$$

Donde:

$V_{\text{NaOH}}$  = Volumen de NaOH consumido.

$N_{\text{NaOH}}$  = Normalidad de NaOH.

p = peso de la muestra en gramos.

En este caso 256,43 es el peso molecular del ácido palmítico debido a que su composición se compone principalmente de ácido palmítico (49-68%) y dependiendo de su dureza hasta un 60% de tripalmitina, que es un triglicérido de ácido palmítico [1], por lo cual, al ser hidrolizada, liberará ácido palmítico.

#### *b. Medición de punto de fusión*

Para la medición de punto de fusión, que solo se realizó al producto inicial, final y los productos comerciales a los cuales se comparó, se siguió la norma NTC 213 [6], se tomaron 2 capilares de vidrio de espesor de 0.15 mm, diámetro exterior de 0,16 mm y sus puntas abiertas, los cuales se llenaron del sustrato fundido previamente y se sellaron en uno de sus laterales, estos se enfriaron en agua a 4 °C durante 25 minutos. Seguido a esto, se adhirieron los capilares con un elástico a al bulbo de un termómetro de mercurio con resolución de 2 °C. Este fue sumergido en un baño de aceite cristal, el cual se calentó lentamente, y se registró la temperatura donde el sustrato en el capilar comenzara a ascender.

#### *C. Procesamiento de datos*

Los datos resultantes del diseño experimental se procesaron en el software estadístico Statgraphics 19, donde se identificaron las mejores condiciones de los factores evaluados para determinar los parámetros aptos para la obtención de FFA mediante el uso de una RSM. Se realizó la comprobación de supuestos y se generó un modelo que describe el comportamiento de la acidez a partir de los tres factores evaluados.

Luego de obtener los datos apropiados se hizo un cálculo con valores aproximados del mercado para junio de 2024, en el cual se consideró: costo de la estearina de palma, costo del agua

gastada y su disposición, tiempo del uso de reactor y gasto energético de este (agitación como calentamiento), tiempo de personal de planta, costo administrativo, precio de la enzima y costo de hidrogenación.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el estudio se encuentran en el apartado de anexos (*Anexo A*). Los datos fueron analizados con el software Statsgraphics 19.

### A. Modelo matemático

Inicialmente se revisa si los resultados de acidez o FFA obtenido cumplen con una distribución normal, realizando una prueba de Kolmogorov-Smirnov dando como un valor p de 0.1436, con lo cual se puede afirmar que los datos provienen de una distribución normal. En la Fig 9 se puede observar el histograma para los datos de acidez.

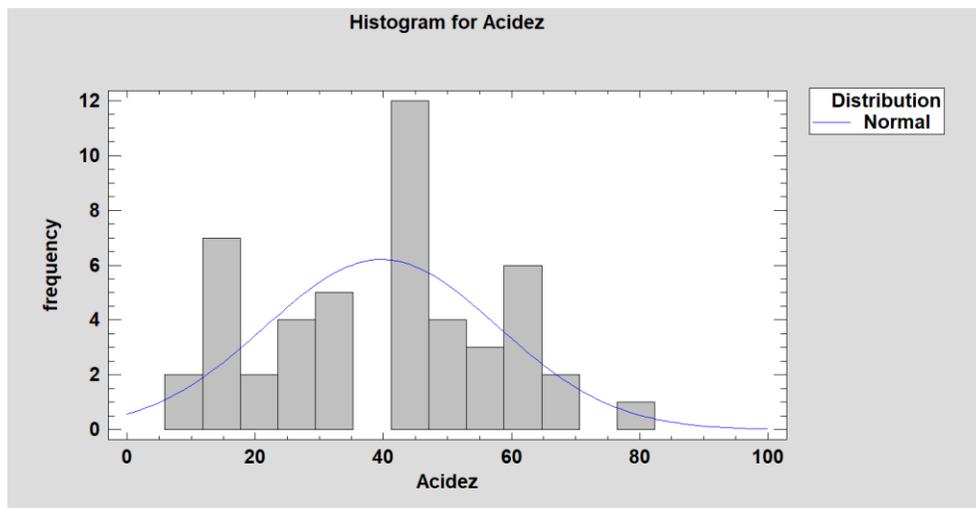


Fig 9. Histograma para la variable de acidez comparado con una distribución normal.

Seguido a esto se realizó, un modelo con interacciones dobles, triple y cuadráticas, además de algunas conjugadas para evaluar a través un ANOVA y con el apoyo de gráficos de Pareto su significancia con respecto a la variable de acidez. De esta manera se retiraban las variables que no mostraron una interacción significativa, así obteniendo en la Fig 10 el gráfico de Pareto con las interacciones significativas.

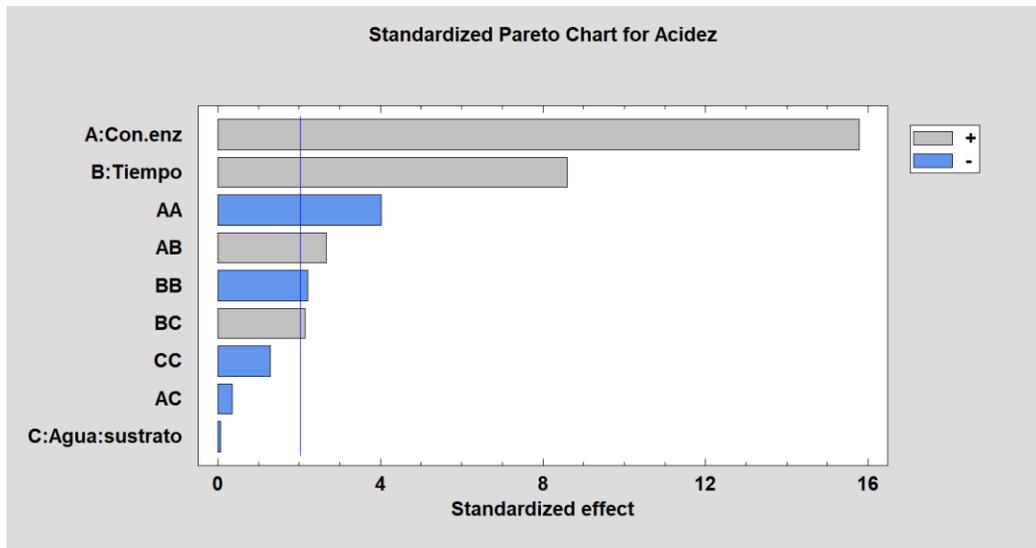


Fig 10. Gráfico estandarizado de Pareto para la variable dependiente.

De esta manera la ecuación resultante para modelar la acidez bajo los parámetros de tiempo, concentración de enzima y cantidad de agua por sustrato se muestra en la ecuación 2.

$$Acidez = -13,7527 + 230,798 * A + 4,97248 * B + 0,350524 * C - 396,749 * A^2 + 13,6467 * AB - 0,176667 * AC - 0,855212 * B^2 + 0,0684583 * BC - 0,00497859 * C^2 \quad (2)$$

Donde:

A = cantidad de enzima en % w/w.

B = Tiempo de reacción en horas.

C = Relación agua: sustrato en % w/w.

Evaluando su ajuste, se obtienen los resultados del análisis de ajuste (TABLA III).

TABLA III.  
RESULTADOS DEL AJUSTE DEL MODELO PARA PREDECIR ACIDEZ.

Prueba	Resultado
R <sup>2</sup>	90,8652 %
Error estándar estimado	6,26859
Error promedio absoluto	3,52481
Valor p del estadístico	0,9572
Durbin-Watson	

Como se puede observar en la TABLA III, se logró un buen ajuste del modelo con las métricas de  $R^2$  y MAE, teniendo un alto valor para la prueba de  $R^2$ , y relativamente un valor bajo para la prueba de MAE, lo cual demuestra un buen ajuste del modelo con respecto a los datos experimentales, también se puede asegurar que no existe una correlación de los residuos gracias a los resultados de la prueba de Durbin-Watson con su valor  $p$  siendo mayor que 0.05.

Con respecto a los residuos del modelo, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la cual da como resultado un valor  $p$  de 0.0911, con lo cual se puede corroborar que los residuos siguen una distribución normal. En la Fig 11 se puede observar la distribución de los residuos.

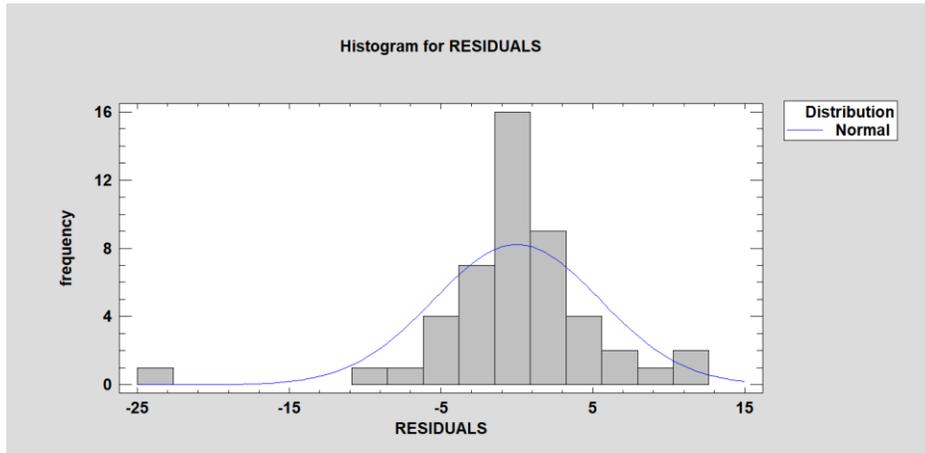


Fig 11. Histograma de los residuos del modelo comparado con la distribución normal.

Consiguientemente se evaluó que la varianza de las poblaciones fuera igual, con la prueba de Levene. De esta manera se obtuvo los resultados de las pruebas, con su valor  $p$  (

TABLA IV)

TABLA IV.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LEVENE PARA LAS VARIABLES INDEPENDIENTES

Variable independiente	Valor $p$
Concentración de enzima (% w/w)	0.1616
Tiempo (Horas)	0.6964
Agua: sustrato (% w/w)	0.1613

Así corroborando todas las suposiciones (normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad) tanto para el modelo como para sus residuos, se puede confiar en los resultados del modelo generado.

También se puede observar cómo se comporta el modelo en el espacio, con respecto a las variables independientes como en la gráfica del RSM para concentración de enzima, tiempo y cantidad de agua: sustrato observado en la Fig 12.

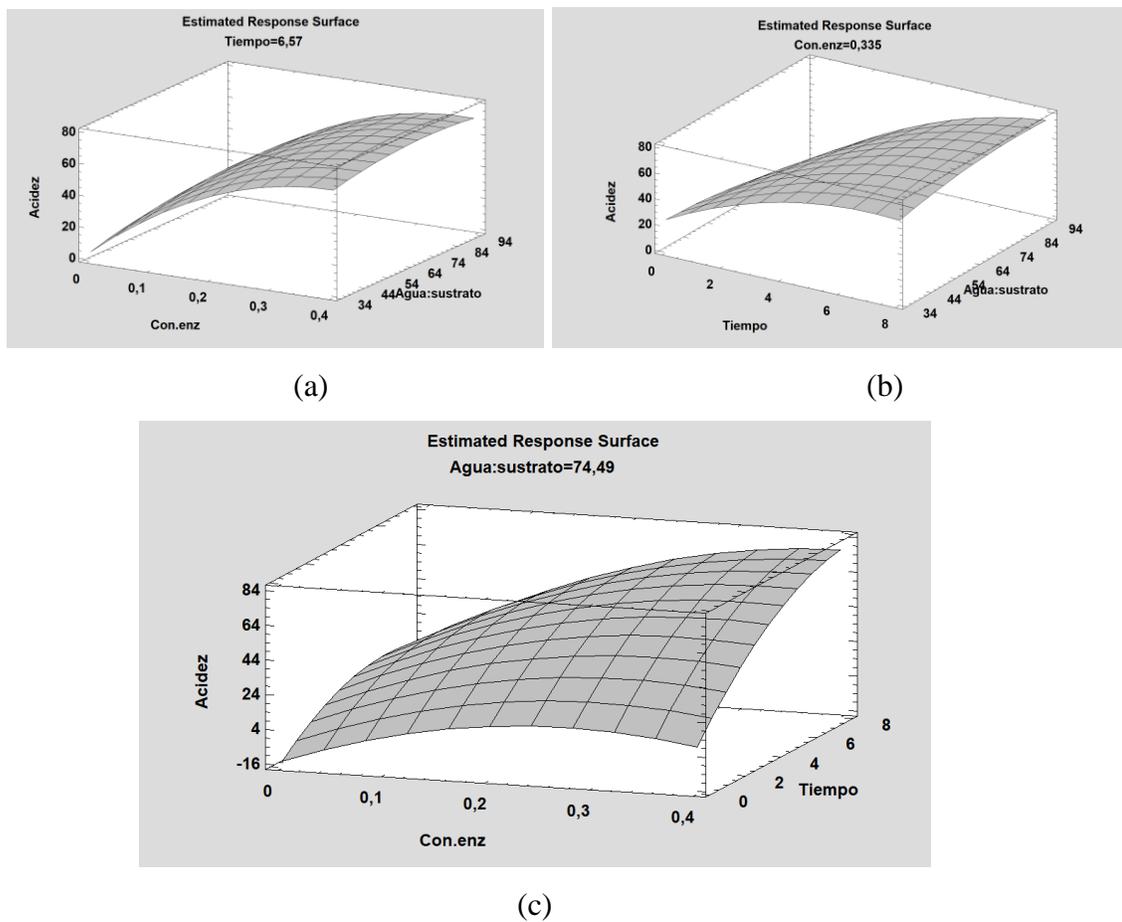


Fig 12. Gráfico de 3 dimensiones donde se puede mostrar el comportamiento de concentración de enzima, tiempo y concentración de agua: sustrato para la obtención de FFA.

Por lo cual, se puede observar un mayor valor de acidez a mayores valores de concentración de enzima de una manera marcada comparado con la relación de agua: sustrato, por otra parte también se puede observar en menor manera la interacción del tiempo si comparamos las Fig 12.a

y Fig 12.b, y se puede apreciar el poco efecto que tiene la variación de la relación de agua: sustrato con respecto a la concentración de enzima y el tiempo de reacción, además se puede percibir el gran efecto que tiene la relación de concentración de enzima y el tiempo de reacción el cual es observado en la Fig 12.c corroborando los efectos encontrados en las pruebas ANOVA y los valores observados en el gráfico de Pareto (Fig 10)

Por consiguiente, se evalúa el efecto de cada variable independiente y su respuesta con la acidez, a través de una gráfica (Fig 13).

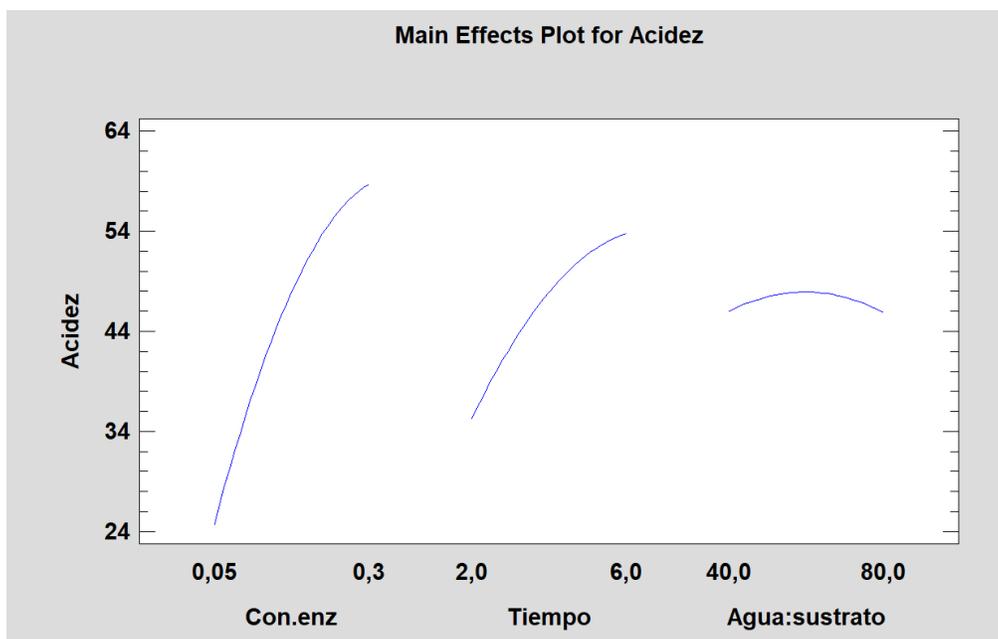


Fig 13. Gráfico de los efectos individuales de cada variable independiente.

De la cual, se puede evidenciar un crecimiento exponencial en la variable de cantidad de enzima como se encuentra en la literatura como en el caso de García [30], de manera similar para la variable de tiempo solo que en este caso con menor pendiente. También en sendos casos se puede vislumbrar un inicio de estabilización del sistema, similar a los estudios de Serri *et al* [33]. Por el contrario, para el caso de la relación agua: sustrato, se evidencia un decrecimiento luego de 74.49 %, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Serri *et al* [33], García [30], debido a las interacción de la enzima al diluirse y no poder formar micelios con facilidad o la extrema disolución de esta lo que genera problemas en la capa superficial del agua en emulsión limitando la superficie

de contacto, como lo menciona Casas-godoy [41] y Serri *et al* [33], aunque cabe resaltar que el efecto de la relación de agua: sustrato es el de menor interacción con el modelo generado.

A partir de la ecuación 2 se obtuvo las condiciones más adecuadas para la generación de FFA en la estearina de palma (TABLA V).

TABLA V.  
CONDICIONES ADECUADAS PARA LAS GENERACIÓN DE FFA.

Factor	Condiciones adecuadas
Concentración enzima (% w/w)	0,335
Tiempo (Horas)	6,574
Agua: sustrato (% w/w)	74,493

Así se obtuvo un valor predicho para acidez y sus rangos límites posibles (TABLA VI).

TABLA VI.  
VALOR PREDICHO CON LAS CONDICIONES ADECUADAS

Valor predicho (% acidez)	Límite inferior 95 % (% acidez)	Límite superior 95 % (% acidez)
72,4616	64,1021	80,8212

### B. Comprobación del modelo

De esta manera, para evaluar la ecuación 2, se realizan 3 pruebas adicionales siguiendo las mismas condiciones descritas en la sección de metodología, usando los parámetros adquiridos en la TABLA V, de esta manera se obtienen los resultados mostrados en la TABLA VII.

TABLA VII.  
RESULTADOS DE PRUEBAS ADICIONALES CON LAS CONDICIONES ADICIONALES.

Prueba	Resultado de acidez (%)
1	80,04
2	76,00
3	70,74
Promedio	75,59

Comparando el valor promedio de la TABLA VII con el valor estimado de acidez dado por la TABLA VI, se tiene un porcentaje de error de 4,3 % relativo y 3,13 % absoluto, lo cual para este estudio es un porcentaje aceptable debido al intervalo de confianza del 95 %.

Además de poder comparar los puntos de fusión inicial y final de la estearina de palma sin procesar y procesada consignada en la TABLA VIII.

TABLA VIII.  
COMPARACIÓN DE PUNTO DE FUSIÓN INICIAL Y FINAL.

Producto	Acidez (%)	Punto de fusión (°C)
Estearina de palma	1,17	48
Estearina de palma hidrolizada	75,59	56

### C. Análisis de costos

Primeramente, es de interés conocer los costos por hora del proceso, para ello primero se calcula el costo del personal necesario por hora el cual puede ser observado en la TABLA IX.

TABLA IX.  
COSTOS DEL PERSONAL DE PLANTA.

Descripción	Cantidad	Costo (COP)	Horas	Días laborados	Costo/hora (COP)
Coordinador de planta	1	\$ 1.900.000,00	8	6	\$ 9.895,83
Personal de producción	4	\$ 2.400.000,00	10	5	\$ 12.000,00
Auxiliar de producción	2	\$ 1.600.000,00	8	6	\$ 8.333,33
Personal administrativo	1	\$ 2.400.000,00	10	5	\$ 12.000,00
Administrador	1	\$ 5.000.000,00	10	5,5	\$ 22.727,27
Total hora	9	\$ 13.300.000,00	46	27,5	\$ 64.956,44

Seguido a esto es necesario conocer los costos de arrendamiento y arrendamiento, energía gastada teniendo un motor de 230 Voltios el cual como máximo puede llegar a 20 Amperios, colocando el valor de corriente en 18 Amperios, además de tener en cuenta que, al finalizar el proceso, se requiere un decante del producto de al menos dos horas, estos rubros son consignados en la TABLA X.

TABLA X.  
COSTOS DE INFRAESTRUCTURA DE PLANTA Y PERSONAL.

Descripción	Tipo	Valor hora (COP)
Energía	KW/H	\$ 4.879,17
Personal	Hora	\$ 64.956,44
Arrendamiento	Hora	\$ 17.732,65
Total	Hora	\$ 87.568,26

Ahora, para el costo de las materias primas, se realiza con un precio de intercambio de dólar a 4.167,87 COP, con lo cual se obtiene la TABLA XI donde se denotan estos costos.

TABLA XI.  
COSTOS DE MATERIA PRIMA.

Descripción	Costo (COP)
Enzima (kg)	\$ 104.184,50
Agua (kg)	\$ 6,23
Estearina	\$ 3.125,00
Hidrogenación	\$ 6.157,00

Ahora con estos costes, se puede realizar una ecuación donde se relacione las cantidades de concentración de enzima, tiempo de reacción y relación agua: sustrato, sin embargo, en este caso se tiene en cuenta la capacidad del reactor, el cual sería de 11 toneladas, y gracias a este valor calcular la cantidad de estearina a procesar a base de la relación de agua: sustrato como se puede observar en la ecuación 3.

$$C_{est} = \frac{1 + C}{Cr} \quad (3)$$

Donde:

$C_{est}$  = proporción de estearina en reactor para la producción de 1 kg.

$Cr$  = capacidad del reactor en kg.

$C$  = relación de agua sustrato.

De esta forma, se establece una ecuación de costos, teniendo en cuenta que la cantidad de estearina de palma también está relacionada con el tiempo de producción como se aprecia en la ecuación 4.

$$\text{Costo} \left( \frac{\text{COP}}{\text{kg}} \right) = P_{est} + P_{dec} * C_{est} + P_{enz} * A + P_{agua} * C + C_{est} * C_{tiemp} * B \quad (4)$$

Donde:

$P_{est}$  = costo de 1 kg de estearina.

$P_{dec}$  = costo del decante.

$P_{enz}$  = precio 1 kg de enzima.

$A$  = cantidad de enzima en porcentaje.

$P_{agua}$  = costo de 1 kg de agua.

$C$  = relación de agua: sustrato en porcentaje.

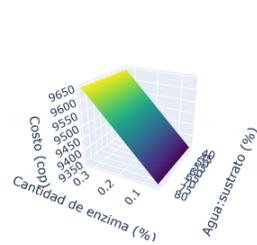
$C_{tiemp}$  = costo de tiempo de producción.

$B$  = tiempo de reacción en horas.

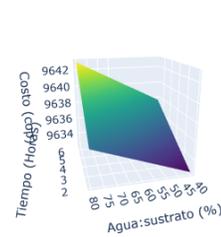
De este modo con uso de la ecuación (4) se llega a un costo base de 9.282 COP por kilogramo de estearina hidrogenada, se realiza un RSM similar a la Fig 12, para observar el comportamiento de los costos con la variación de los parámetros bajo los mismos niveles establecidos en la TABLA II. Obteniendo entonces la Fig 14 donde se muestra el comportamiento de las variables independientes con respecto al costo del producto.

Costo cantidad de enzima vs agua sustrato, Tiempo: 6.57 horas

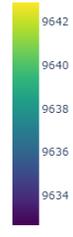
Costo cantidad de enzima vs agua sustrato, cantidad de enzima: 0.33 %



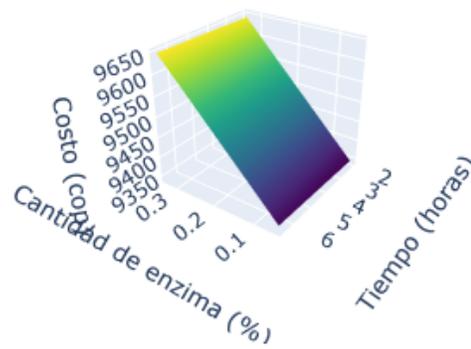
(a)



(b)



Costo cantidad de enzima vs tiempo, Agua:sustrato 74,49 %



(c)

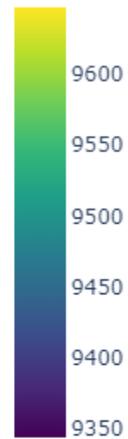


Fig 14. Gráfico del comportamiento del costo variando los parámetros de cantidad de enzima, tiempo de reacción y relación agua: sustrato.

A partir de esto, se puede establecer un paralelismo con los resultados de la ecuación 2 y la ecuación 4, teniendo un mayor peso en las variables de concentración de enzima y tiempo de reacción con respecto a la relación agua: sustrato, sin embargo, cabe resaltar la importancia del costo de agua: sustrato mediante el manejo de los residuos después de la reacción, lo cual puede generar tiempos adicionales en la producción, aunque cabe resaltar que estos desechos al ser orgánicos y biodegradables son de fácil manejo comparado con otras alternativas.

Sin embargo, esta visión de costos debe ser comparada con la acidez generada por el modelo dado por la ecuación 2, para ello se mantienen constantes 2 variables independientes,

con los valores donde las condiciones son apropiadas para generar FFA mostrados en la TABLA VI y variando el valor de una de estas con los rangos establecidos en la TABLA II, obteniendo así la Fig 15, donde se compara la variación de cantidad de enzima, tiempo de reacción y relación de agua: sustrato con respecto a su costo y su acidez predicha.

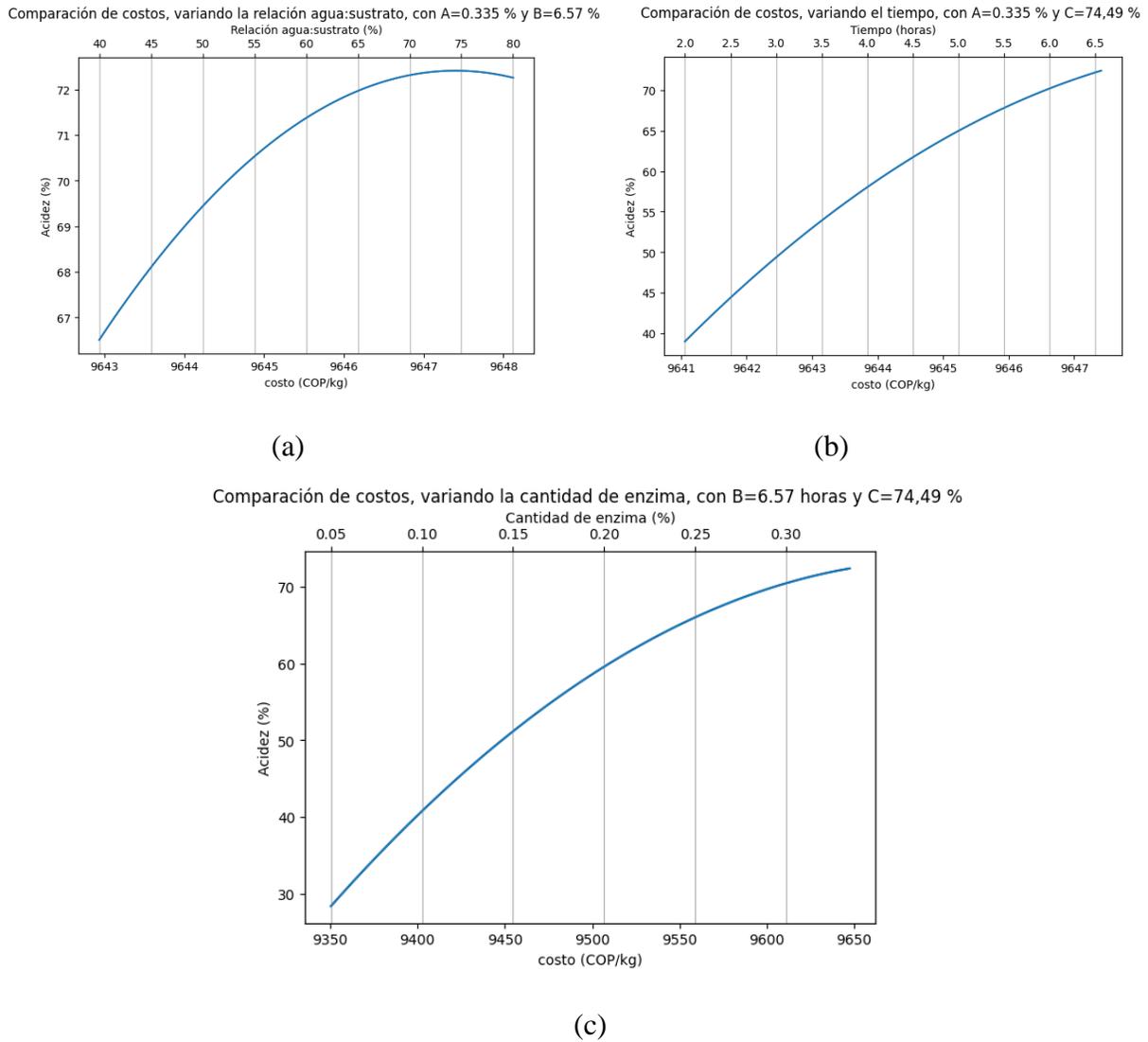


Fig 15. Graficas de costos variando un parámetro y comparando su costo con la acidez predicha.

De esta forma, se aprecia un comportamiento en términos de costos similar en la obtención de FFA en la estearina de palma observado en la Fig 13, sobre todo en el comportamiento de la relación agua: sustrato (Fig 15.a), el cual pese a lo establecido en la Fig 13, Fig 12 y las constantes

de la ecuación 2, en este caso se observa un decremento de acidez pese a un aumento de costo de una manera marcada.

Por otra parte, se observa un comportamiento similar entre la Fig 15.b y Fig 15.c, y una relación exponencial en términos de costos, aumentando la acidez de un incremento en costos de forma exponencial. Alcanzando en sendos casos un valor máximo de acidez de 72,4% y con costo de 9.647,41 COP/kg.

#### *D. Comparación del producto final con muestras comerciales.*

Se realizó una comparación entre muestras comerciales adquiridas de diferentes fuentes con el producto final obtenido. Estos resultados se pueden observar en la TABLA XII.

TABLA XII.  
COMPARACIÓN DEL PRODUCTO OBTENIDO CON MUESTRAS COMERCIALES.

Producto	Proveedor	Acidez (%)	Punto de fusión (°C)	Precio por kg (COP)
Acido esteárico 2P	Protokimica SA	90,25	60	35.000
Acido esteárico 3P	Protokimica SA	95,73	60	39.000
Acido esteárico triple <sup>a</sup>	Suquin SA [59]	95	69.6	25.000
Producto obtenido	Propio	75,59	56	9.647,41

a, contiene 45 % ácido palmítico, 50 % ácido esteárico y 5 % de ácido oleico [59].

Cabe resaltar que el ácido esteárico 2P y 3P, la P se denota de prensado, el cual usualmente se obtiene luego de hidrolizar el sustrato, se prensa a temperatura ambiente o ligeramente fría (18-20 °C) [60], ya que el ácido palmítico y esteárico al tener un mayor punto de fusión (62-65 °C) que el ácido oleico (15 °C [60]) se prensa 2 o 3 veces para extraer todo su contenido de este, quedando así una combinación de ácido esteárico y palmítico usualmente en 55% y 45 % [16], y asegurar un contenido mínimo de ácido oleico de 10 y 5% [16], [60].

En este caso se puede observar una diferencia de acidez con el valor aproximadamente de 17,07 % con las muestras comerciales y en el caso del punto de fusión de 4 °C, esto debido

principalmente a no lograr hidrolizar todos los triglicéridos presentes, lo cual mantendría un punto de fusión similar a la inicial (48 °C).

Pese no alcanzar una acidez del 90 % se encuentra que el método por saponificación tiene resultados hasta un 84 % de acidez [61] para su principal uso en la fabricación de bio-lubricantes, sin embargo en esta industria es más importante la viscosidad y oxidación. Pese a esto, el producto se puede usar para la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), mediante el estudio de Afifah *et al* [62], se puede apreciar un perfil ácido similar al estimado de este estudio (TABLA I) en la TABLA XIII.

TABLA XIII.  
COMPOSICIÓN DE FAME ADQUIRIDO POR AFIFAH *ET AL* [62].

Ésteres metílicos de ácidos grasos	Composición (%)
Laurato de metilo (Ácido láurico)	0.33
Miristato de metilo (Ácido mirístico)	1.52
Palmitato de metilo (Ácido palmítico)	55.11
Estearato de metilo (Ácido esteárico)	4.32
Oleato de metilo (Ácido oleico)	25.91
Linoleato de metilo (Ácido linoleico)	5.63
Linolenato de metilo (Ácido linolénico)	0.44
Conversión total de FAME	95.26

Con un proceso de esterificación adicional, el cual se ve beneficiado la presencia de los FFA en vez de triglicéridos [63].

Otro caso de uso, similar al de biolubricantes es como materia prima para la formación de biodiesel, gracias a que sus propiedades cumplen con la normativa de la sociedad estadounidense para pruebas de materiales (ASTM) demostrado por Hariram *et al* [64].

Además, que en el caso de su uso como precursor para biocombustibles y biolubricantes no se requiere un proceso de hidrogenación, así que tiene un costo reducido a 3.490,41 COP/kg para su producción.

Así pese a no obtener un valor de acidez para comercializarse en el ámbito cosmético del 90% como mínimo se pueden generar formulaciones con este debido a su alto valor de acidez, aunque esto implica una reducción de su costo para la venta, pero este al tener un bajo costo de producción comparado con la competencia como se observa en la TABLA XII, permite ser un mercado por explorar en el ámbito comercial para generar nuevas relaciones e incentivar la inversión de las industrias con métodos alternativos y con un menor gasto energético.

Por otra parte, se tiene un producto con un bajo coste, con 365,61 COP/kg de precio agregado a base de la estearina de palma para las industrias de biolubricantes, biocombustibles y jabonería especializada a la piel la cual usa los FFA como surfactante [65]. Lo cual da un margen de ganancias para su refinamiento y permite un precio competitivo en el mercado posibilitando la inclusión del nuevo producto a estas industrias.

## IX. CONCLUSIONES

La lipasa proveniente del hongo *Candida rugosa* resulta ser eficaz para la producción de FFA aumentando la acidez a partir de estearina de palma.

Además, gracias a la implementación de un RSM se permitió encontrar los parámetros de cantidad de enzima, tiempo de reacción y cantidad de agua: sustratos apropiados para la obtención de FFA usando como sustrato base la estearina de palma. Asimismo, se validó los resultados obtenidos mediante estadística descriptiva, los cuales pasaron exitosamente las pruebas y supuestos estadísticos para generar un modelo matemático que describiera el fenómeno, y así poder comparar el peso de cada variable y su importancia en la obtención de FFA, el cual demostró una mayor influencia en cantidad de enzima y tiempo comparado con la cantidad de agua: sustrato.

Gracias a esto, se tiene un modelo predictivo robusto el cual consta con un bajo valor de error, comparando la predicción de 72.46 % con el valor real de 75.59%, el cual se encuentra en los límites definidos por desviación estándar del modelo, lo cual demuestra una excelente capacidad de predicción bajo condiciones similares.

Con esto se pudo establecer un costo aproximado para el producto el cual se estima en 9.647,41 COP/kg, y en el caso de no necesitar hidrogenación (como en las industrias de biolubricantes y biocombustibles) con un costo de 3.490,41 COP/kg, y en este caso se tiene una mayor influencia de cantidad de enzima, relación agua: sustrato y tiempo en este orden. Además de encontrar mayores costos por el aumento en la relación agua: sustrato con una disminución de la acidez.

Pese a no alcanzar una acidez o punto de fusión similar a los encontrados en muestras comerciales para aplicaciones de la industria cosmética, sigue estando en los rangos aceptados para la industria de jabón en especial los jabones especializados para piel [66], y su posible uso como surfactante [65], además de poder realizar formulaciones específicas en un rango de acidez de 0 a 72,46 %, evaluar su viabilidad económica y posible precio de venta, además de variar los parámetros de producción dependiendo de las condiciones y tiempos de planta, lo cual abre las

puertas a una mejor negociación para necesidades específicas de esta industria [67]. Y en el caso de lubricantes se requiere realizar pruebas de viscosidad y oxidación, pero en el caso de la acidez se podría usar para la fabricación de bio-lubricantes [61], de misma forma como materia prima para la fabricación de biodiesel [64]. Dando así a luz un producto comercializable y con un buen margen de ganancias.

Así se obtuvo un producto que apoya las metas del PND, con las características de reducción del gasto energético, disminución de la dependencia de productos químicos, el uso eficiente de recursos, incorporación de materiales recuperados en nuevas cadenas de valor, inclusión de materiales biodegradables y la reducción del consumo de combustibles fósiles.

## XI. RECOMENDACIONES

Se menciona y cotiza la hidrogenación del producto para aumentar su punto de fusión y firmeza al empaclado más no se realiza el proceso de hidrogenación, se recomienda realizar la eficiencia del proceso y el cómo afecta al producto final lo cual facilitaría su empaque y distribución.

Se sugiere realizar un proceso de extrapolación con un aumento en el tiempo de reacción, el cual resulta ser más barato que la cantidad de enzima, para obtener valores más altos de acidez, lo cual puede aumentar el valor comercial del producto.

Es importante validar otras características del proceso, como su contenido de insaturaciones o su perfil ácido del producto, para así tener un mayor conocimiento de la estructura del producto y poder tener más alcance al comercializarlo, ya que teóricamente tiene un mayor contenido de ácido palmítico, pero al asegurarlo puede facilitar su uso en la industria.

Para la separación de los FFA dentro del producto final se puede disolver en alcohol etílico y calentarlo hasta 70°C, entonces se deja enfriar a 62,5 °C y se comenzaran a cristalizar las partes de ácido palmítico, esteárico y los ácidos saturados, mientras que los ácidos insaturados y glicéridos se mantienen disueltos en el alcohol [68].

Se puede realizar un estudio de la recuperación de la glicerina que queda disuelta en el agua y su impacto económico al proceso presentado en este estudio. Además de un estudio adicional a reutilización del agua de la enzima, ya que esta sigue teniendo capacidades para hidrolizar, lo cual puede ayudar a reducir los costos [69].

## REFERENCIAS

- [1] G. Pande, C. C. Akoh, and O.-M. Lai, “Food Uses of Palm Oil and Its Components,” in *Palm Oil*, Elsevier, 2012, pp. 561–586. doi: 10.1016/B978-0-9818936-9-3.50022-8.
- [2] N. KALYANA SUNDRAM and N. CHANDRASEKHARAN, “Aspectos nutricionales y de salud de la estearina de palma: percepciones y hechos,” *PALMAS*, vol. 20, no. 3, p. 12, 1999.
- [3] M. Molano, D. Riveros, and E. Vargas, “Estudio de la hidrólisis del crudo de aceite de palma africana empleando como catalizador la lipasa de la levadura *C.rugosa*,” *Rev. Ing.*, no. 22, pp. 45–53, Nov. 2005.
- [4] PubChem, “Stearic Acid.” Accessed: Mar. 19, 2024. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281>
- [5] ICONTEC, “NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 218.” ICONTEC, 2016.
- [6] ICONTEC, “NTC 213 GRASAS Y ACEITES VEGETALES Y ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN (PUNTO DE DESLIZAMIENTO).” ICONTEC, 2003.
- [7] “Palm Oil | USDA Foreign Agricultural Service.” [Online]. Available: <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/4243000>
- [8] Fedepalma, “¡Récord histórico! La producción de aceite de palma en Colombia supera expectativas en 2023,” *El Palmicultor*. Accessed: Mar. 19, 2024. [Online]. Available: <https://elpalmicultor.fedepalma.org/sector-palmero-colombiano-buen-balance-2023/>
- [9] K. T. Tan, K. T. Lee, A. R. Mohamed, and S. Bhatia, “Palm oil: Addressing issues and towards sustainable development,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 420–427, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.rser.2007.10.001.
- [10] A. Iniesta García, “TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EL ACEITE DE PALMA: PROBLEMÁTICA SOCIAL, MEDIOAMBIENTAL Y NUTRICIONAL,” 2020, [Online]. Available: [https://www.um.es/documents/2918258/18875715/Escrita\\_CyT\\_IES+Marqu%C3%A9s+de+los+V%C3%A9lez.pdf/8dd2eb0a-bf69-428e-b21a-caad60899f3d](https://www.um.es/documents/2918258/18875715/Escrita_CyT_IES+Marqu%C3%A9s+de+los+V%C3%A9lez.pdf/8dd2eb0a-bf69-428e-b21a-caad60899f3d)
- [11] “pome - aguas residuales de la extracción de aceite de palma africana,” *Biodigestores - plantas de biogas - generadores - energía*. Accessed: Mar. 16, 2024. [Online]. Available: <https://www.aqualimpia.com/biodigestores/pome/>
- [12] “Oil palm fibers as papermaking material: Potentials and challenges :: BioResources.” [Online]. Available: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/>
- [13] S. Shinoj, R. Visvanathan, S. Panigrahi, and M. Kochubabu, “Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 33, no. 1, pp. 7–22, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.indcrop.2010.09.009.
- [14] “Aceites vegetales: consumo doméstico en el mundo por tipo 2023/2024,” *Statista*. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <https://es.statista.com/estadisticas/564768/consumo-domestico-de-los-principales-aceites-vegetales-segun-tipo/>
- [15] J. P. Caliman, R. Carcasses, N. Perel, J. Wohlfahrt, P. Girardin, and A. W. Pujianto, “Indicadores agro-ambientales para la producción sostenible de aceite de palma,” *Palmas*, vol. 28, no. especial, Art. no. especial, Jan. 2007.
- [16] L. Acid, “Final report on the safety assessment of oleic acid, lauric acid, palmitic acid, myristic acid, and stearic acid,” *J Am Coll Toxicol*, vol. 6, pp. 321–401, 1987.

- [17] T. A. Patil, D. N. Butala, T. S. Raghunathan, and H. S. Shankar, "Thermal hydrolysis of vegetable oils and fats. 1. Reaction kinetics," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 27, no. 5, pp. 727–735, May 1988, doi: 10.1021/ie00077a001.
- [18] ObservadoresCol, "Análisis variables de energía en Colombia." Mar. 09, 2024. [Online]. Available: <https://observadorescol.org/wp-content/uploads/ObservadoresCol-Informe-Energetico-Colombiano-Marzo-5-2024.pdf>
- [19] J. Chang, Y. Xia, S. Ma, X. Fang, and M. Sun, "Improvement of saponification extraction method for fatty acids separation from geological samples," *Acta Geochim.*, vol. 35, no. 2, pp. 148–155, Jun. 2016, doi: 10.1007/s11631-016-0095-5.
- [20] "Review on Chemical treatment of Industrial Waste Water | Journal of Applied Sciences and Environmental Management." Accessed: Jul. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.ajol.info/index.php/jasem/article/view/92473>
- [21] C. I. Betton, "Lubricants and Their Environmental Impact," in *Chemistry and Technology of Lubricants*, R. M. Mortier, M. F. Fox, and S. T. Orszulik, Eds., Dordrecht: Springer Netherlands, 2009, pp. 435–457. doi: 10.1023/b105569\_15.
- [22] M. T. S. Syaima, K. H. Ong, I. Mohd Noor, M. I. M. Zamratul, S. A. Brahim, and M. M. Hafizul, "The synthesis of bio-lubricant based oil by hydrolysis and non-catalytic of palm oil mill effluent (POME) using lipase," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 44, pp. 669–675, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.rser.2015.01.005.
- [23] Departamento Nacional de Planeación, "Plan Nacional de Desarrollo 2022-2026." Accessed: Jul. 15, 2024. [Online]. Available: <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/portalDNP/PND-2023/2023-05-04-bases-plan-nacional-de-inversiones-2022-2026.pdf>
- [24] D. C. Riveros Medina, "ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DEL CRUDO DE ACEITE DE PALMA AFRICANA," 2005.
- [25] FEDEPALMA, "SUSTAINABILITY REPORT OF THE COLOMBIAN PALM OIL SECTOR 2018-2021."
- [26] "PEN 2020-2050," Looker Studio. Accessed: Jul. 15, 2024. [Online]. Available: <http://lookerstudio.google.com/reporting/94e583ab-703c-4b48-853c-daad13312473/page/iX4iB?feature=opengraph>
- [27] 2005/360/EC: Commission Decision of 26 April 2005 establishing ecological criteria and the related assessment and verification requirements for the award of the Community eco-label to lubricants (notified under document number C(2005) 1372) (Text with EEA relevance), vol. 118. 2005. Accessed: Jul. 06, 2024. [Online]. Available: <http://data.europa.eu/eli/dec/2005/360/oj/eng>
- [28] S. Z. Erhan and S. Asadauskas, "Lubricant basestocks from vegetable oils," *Ind. Crops Prod.*, vol. 11, no. 2–3, pp. 277–282, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0926-6690(99)00061-8.
- [29] P. Podchong, C. P. Tan, S. Sonwai, and D. Rousseau, "Composition and crystallization behavior of solvent-fractionated palm stearin," *Int. J. Food Prop.*, vol. 21, no. 1, pp. 496–509, Jan. 2018, doi: 10.1080/10942912.2018.1425701.
- [30] M. García Román, "HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS EN EMULSIONES O/W. APLICACIÓN A FORMULACIONES DETERGENTES," Doctoral, Universidad de granada, Granada, 2005. [Online]. Available: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/767/15750796.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [31] S. Darbha, J. K. Satyarthi, R. Thirumalaiswamy, and S. S. Deshpande, "Procedimiento para producir ácidos grasos," ES2428289T3, Nov. 06, 2013 Accessed: Mar. 25, 2024. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/ES2428289T3/es>

- [32] F. Cardona Serrate, “ALTERACIONES ENZIMÁTICAS EN ALIMENTOS EL PARDEAMIENTO, EL ENRANCIAMIENTO Y LA REACCIÓN.” [Online]. Available: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/147166/Cardona%20-%20ALTERACIONES%20ENZIM%20C%208%20TICAS%20EN%20ALIMENTOS%203A%20EL%20PARDEAMIENTO%20C%20EL%20ENRANCIAMIENTO%20Y%20LA%20REACCI%20C%2093N....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [33] N. A. Serri, A. H. Kamarudin, and S. N. A. Rahaman, “Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil using *C. rugosa* Lipase,” *J. Phys. Sci.*, vol. 19, 2008.
- [34] J. González-Bacerio, J. R. Hernández, and A. del M. Martínez, “Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial,” *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 12, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2010.
- [35] R. M. Daniel, M. Dines, and H. H. Petach, “The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures,” *Biochem. J.*, vol. 317, no. Pt 1, pp. 1–11, Jul. 1996.
- [36] W. M. Linfield, R. A. Barauskas, L. Sivieri, S. Serota, and R. W. Stevenson, “Enzymatic fat hydrolysis and synthesis,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 61, no. 2, pp. 191–195, Feb. 1984, doi: 10.1007/BF02678767.
- [37] J. Roslan, S. M. Mustapa Kamal, K. F. Yunus, and N. Abdullah, “Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) byproduct using response surface methodology,” *Int. Food Res. J.*, vol. 22, no. 3, pp. 1117–1123, 2015.
- [38] L. Lascaray, “Mechanism of Fat Splitting,” *Ind. Eng. Chem.*, vol. 41, no. 4, pp. 786–790, Apr. 1949, doi: 10.1021/ie50472a025.
- [39] L. A. Salazar Carranza *et al.*, “Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial,” *Rev. Cuba. Investig. Bioméd.*, vol. 39, no. 4, Dec. 2020, Accessed: Jun. 13, 2024. [Online]. Available: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0864-03002020000400017&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-03002020000400017&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- [40] “1.8: VIII. Lípidos, transporte, deposición y metabolismo,” LibreTexts Español. Accessed: Jun. 13, 2024. [Online]. Available: [https://espanol.libretexts.org/Salud/Medicina\\_Veterinaria/Una\\_gu%C3%ADa\\_de\\_los\\_principios\\_de\\_la\\_nutrici%C3%B3n\\_animal\\_\(Cherian\)/01%3A\\_Cap%C3%ADtulos/1.08%3A\\_VI%20II.\\_L%C3%ADpidos%20C%20transporte%20C%20deposici%C3%B3n\\_y\\_metabolismo](https://espanol.libretexts.org/Salud/Medicina_Veterinaria/Una_gu%C3%ADa_de_los_principios_de_la_nutrici%C3%B3n_animal_(Cherian)/01%3A_Cap%C3%ADtulos/1.08%3A_VI%20II._L%C3%ADpidos%20C%20transporte%20C%20deposici%C3%B3n_y_metabolismo)
- [41] L. Casas-Godoy, F. Gasteazoro, S. Duquesne, F. Bordes, A. Marty, and G. Sandoval, “Lipasas: An Overview: Methods and Protocols,” in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1835, 2018, pp. 3–38. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9\_1.
- [42] P. Domínguez de María, J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, and A. R. Alcántara, “Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 2, pp. 180–196, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.09.003.
- [43] A. C. B. Padovan, A. S. de A. Melo, and A. L. Colombo, “Systematic review and new insights into the molecular characterization of the *Candida rugosa* species complex,” *Fungal Genet. Biol. FG B*, vol. 61, pp. 33–41, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.fgb.2013.10.007.
- [44] M. A. Pfaller *et al.*, “*Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 10, pp. 3578–3582, Oct. 2006, doi: 10.1128/JCM.00863-06.
- [45] I. Kurtovic, S. Marshall, X. Zhao, and B. Simpson, “Lipasas from Mammals and Fishes,” *Rev. Fish. Sci. - REV FISH SCI*, vol. 17, pp. 18–40, Jan. 2009, doi: 10.1080/10641260802031322.

- [46] L. Rúa, T. Díaz-Mauriño, V. M. Fernández, C. Otero, and A. Ballesteros, "Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1156, no. 2, pp. 181–189, Feb. 1993, doi: 10.1016/0304-4165(93)90134-t.
- [47] R. P. D. Bank, "RCSB PDB - 1LPO: ANALOGS OF REACTION INTERMEDIATES IDENTIFY A UNIQUE SUBSTRATE BINDING SITE IN CANDIDA RUGOSA LIPASE." Accessed: Jun. 17, 2024. [Online]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/1LPO>
- [48] R. P. D. Bank, "RCSB PDB - 1CRL: INSIGHTS INTO INTERFACIAL ACTIVATION FROM AN 'OPEN' STRUCTURE OF CANDIDA RUGOSA LIPASE." Accessed: Jul. 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/1CRL>
- [49] A. I. Khuri and S. Mukhopadhyay, "Response surface methodology," *WIREs Comput. Stat.*, vol. 2, no. 2, pp. 128–149, 2010, doi: 10.1002/wics.73.
- [50] R. H. Myers, A. I. Khuri, and W. H. Carter, "Response Surface Methodology: 1966–1988," *Technometrics*, vol. 31, no. 2, pp. 137–157, May 1989, doi: 10.1080/00401706.1989.10488509.
- [51] G. Karthik Pandiyan and T. Prabakaran, "Optimization of machining parameters on AA6351 alloy steel using Response Surface Methodology (RSM)," *Mater. Today Proc.*, vol. 33, pp. 2686–2689, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.01.369.
- [52] R. W. Emerson, "ANOVA Assumptions," *J. Vis. Impair. Blind.*, vol. 116, no. 4, pp. 585–586, Jul. 2022, doi: 10.1177/0145482X221124187.
- [53] A. Dean, D. Voss, and D. Draguljić, "Response Surface Methodology," in *Design and Analysis of Experiments*, A. Dean, D. Voss, and D. Draguljić, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 565–614. doi: 10.1007/978-3-319-52250-0\_16.
- [54] K. Rani Das, "A Brief Review of Tests for Normality," *Am. J. Theor. Appl. Stat.*, vol. 5, no. 1, p. 5, 2016, doi: 10.11648/j.ajtas.20160501.12.
- [55] B. W. Yap and C. H. Sim, "Comparisons of various types of normality tests," *J. Stat. Comput. Simul.*, vol. 81, no. 12, pp. 2141–2155, Dec. 2011, doi: 10.1080/00949655.2010.520163.
- [56] B. B. Schultz, "Levene's Test for Relative Variation," *Syst. Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 449–456, Dec. 1985, doi: 10.1093/sysbio/34.4.449.
- [57] J. Li, "Assessing the accuracy of predictive models for numerical data: Not r nor r2, why not? Then what?," *PLOS ONE*, vol. 12, no. 8, p. e0183250, Aug. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0183250.
- [58] D. N. Rutledge and A. S. Barros, "Durbin–Watson statistic as a morphological estimator of information content," *Anal. Chim. Acta*, vol. 454, no. 2, pp. 277–295, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0003-2670(01)01555-0.
- [59] "Ácido Estearico Triple," Suquin S.A.S. Accessed: Jul. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.suquin.com.co/TIENDA/Acido-Estearico-Triple-p454731560>
- [60] D. F. Cranor, "Nature, Manufacture, and General Use of Stearic Acid," *Ind. Eng. Chem.*, vol. 21, no. 8, pp. 719–721, Aug. 1929, doi: 10.1021/ie50236a003.
- [61] M. Matilunaite and T. Paulauskiene, "From concept to practice: manufacturing of bio-lubricants from renewable resources," *Biomass Convers. Biorefinery*, vol. 9, no. 2, pp. 353–361, Jun. 2019, doi: 10.1007/s13399-018-0356-0.
- [62] A. N. Afifah, S. Syahrullail, N. I. Wan Azlee, N. A. Che Sidik, W. J. Yahya, and E. Abd Rahim, "Biolubricant production from palm stearin through enzymatic transesterification method," *Biochem. Eng. J.*, vol. 148, pp. 178–184, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.bej.2019.05.009.

- 
- [63] A. Chowdhury, D. Mitra, and D. Biswas, "Synthesis of biolubricant components from waste cooking oil using a biocatalytic route," *Environ. Prog. Sustain. Energy*, vol. 33, no. 3, pp. 933–940, Oct. 2014, doi: 10.1002/ep.11866.
- [64] V. Hariram, N. Bala Karthikeyan, S. Seralathan, T. Micha Premkumar, and J. Godwin John, "Spectroscopic Characterization of Palm Stearin Biodiesel Derived Through Base Catalysed Transesterification Process," *Nat. Environ. Pollut. Technol.*, vol. 19, no. 3, pp. 981–990, Sep. 2020, doi: 10.46488/NEPT.2020.v19i03.008.
- [65] S. E. Benjamin and A. Abbass, "Effect of superfatting agents on soaps properties," *J Oil Palm Res*, vol. 31, no. 2, pp. 304–14, 2019.
- [66] A. Kuntom and H. Kifli, "Properties of soaps derived from distilled palm stearin and palm kernel fatty acids," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 1, no. 3, pp. 329–334, 1998.
- [67] PORIM, "Importancia del aceite y la estearina de palma como materia prima para la fabricación de jabón." PALMAS. [Online]. Available: <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/download/233/233/>
- [68] B. Calvo, I. Collado, and E. A. Cepeda, "Solubilities of Palmitic Acid in Pure Solvents and Its Mixtures," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 54, no. 1, pp. 64–68, Jan. 2009, doi: 10.1021/je8005979.
- [69] M. Tanigaki, M. Sakata, H. Takaya, and K. Mimura, "Hydrolysis of palm stearin oil by a thermostable lipase in a draft tube-type reactor," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 80, no. 4, pp. 340–345, Jan. 1995, doi: 10.1016/0922-338X(95)94201-2.

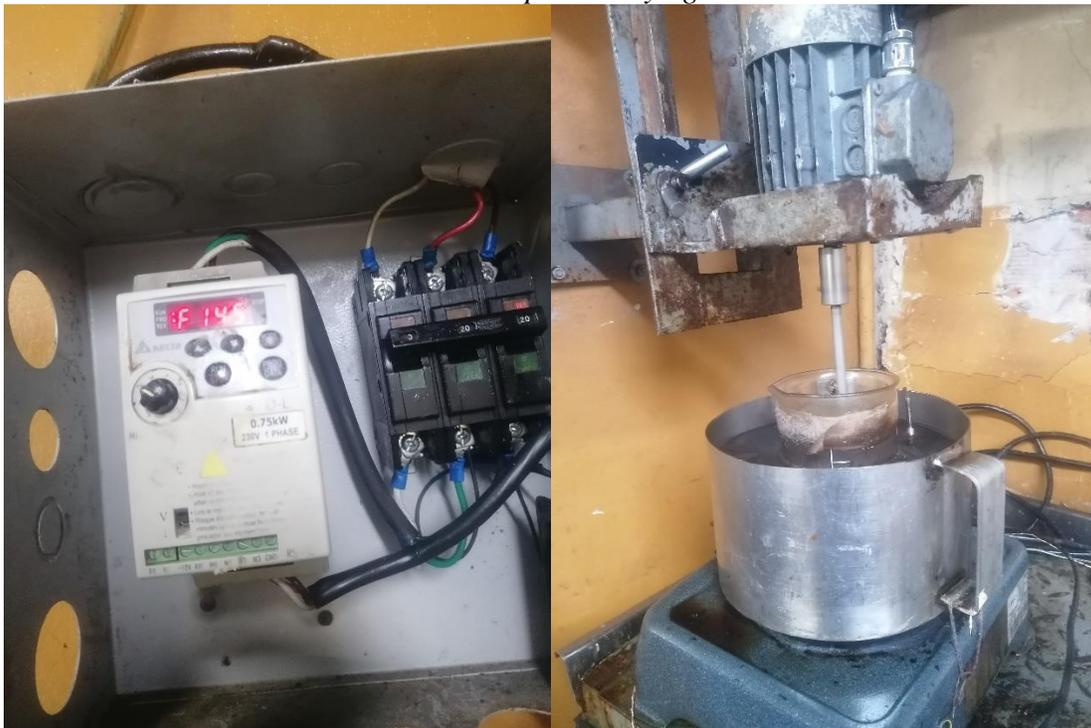
## ANEXOS

*Anexo A. Resultados de las pruebas elaboradas*

Numero de prueba	Conc. Enzima	Tiempo	Agua/sustrato	Acidez
	%wt	horas	%v	%
1	0,3	6	80	62,32
2	0,3	6	40	67,40
3	0,175	6,57438	60	47,57
4	0,175	4	60	59,83
5	0,175	1,42562	60	28,94
6	0,335899	4	60	64,27
7	0,175	4	34,2562	47,38
8	0,3	2	40	46,94
9	0,3	2	80	13,99
10	0,05	6	40	32,52
11	0,05	6	80	29,48
12	0,175	4	85,7438	44,43
13	0,05	2	40	18,10
14	0,0141014	4	60	9,32
15	0,05	2	80	9,41
16	0,175	4	60	48,07
17	0,3	6	80	65,45
18	0,3	6	40	57,69
19	0,175	6,57438	60	53,1
20	0,175	4	60	45,85
21	0,175	1,42562	60	31,64
22	0,335899	4	60	60,11
23	0,175	4	34,2562	43,95
24	0,3	2	40	43,49
25	0,3	2	80	44,44
26	0,05	6	40	23,84
27	0,05	6	80	28,68
28	0,175	4	85,7438	45,06

29	0,05	2	40	14,25
30	0,0141014	4	60	13,08
31	0,05	2	80	13,83
32	0,175	4	60	45,07
33	0,3	6	80	78,65
34	0,3	6	40	63,37
35	0,175	6,57438	60	54,52
36	0,175	4	60	46,24
37	0,175	1,42562	60	31,78
38	0,335899	4	60	60,87
39	0,175	4	34,2562	34,83
40	0,3	2	40	43,59
41	0,3	2	80	44,9
42	0,05	6	40	21,16
43	0,05	6	80	26,83
44	0,175	4	85,7438	46,11
45	0,05	2	40	15,88
46	0,0141014	4	60	12,28
47	0,05	2	80	15,39
48	0,175	4	60	50,6

*Anexo B Sistema de control de temperatura y agitación en el laboratorio.*





Anexo C Poster de presentación de la práctica.

Programa de Bioingeniería

DETERMINACIÓN DE CONDICIONES APROPIADAS PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE LA ESTEARINA DE PALMA



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Facultad de Ingeniería

PRACTICANTE: Miguel López Vélez

ASESORES: Francisco José Campuzano Cardona, Álvaro José Herazo Vega

PROGRAMA: Bioingeniería

Modalidad de la práctica: 2024-1

La hidrólisis de glicéridos consiste en la formación de ácidos grasos libres (FFA) y glicerina, en este caso usando como catalizador la lipasa de la levadura *Candida rugosa* y como sustrato estearina de palma. Se encontró mediante un diseño experimental de superficie de respuesta (RSM) las mejores condiciones para la obtención de FFA, se varió la cantidad de enzima, el tiempo de reacción y la cantidad de sustrato, midiendo la acidez como variable respuesta. Se obtuvo un producto con alta acidez, mayor solidez y color blanco, adecuado para la industria jabonera, lubricantes y biocombustibles. El modelo predictivo desarrollado indicó un porcentaje de FFA del 72.46 % predicho y 75.59 % real, validando la eficiencia del proceso de hidrólisis con las condiciones apropiadas y obteniendo un producto comercial.



Fig 1. Resultados obtenidos, de izquierda a derecha, estearina de palma sin hidrolizar, ácido esteárico y estearina de palma hidrolizada



Introducción

Entre 2023 y 2024, Colombia se destacó como el cuarto mayor productor mundial de aceite de palma y el primero en América Latina, con un aumento del 4.1% en 2023. Este crecimiento, sin embargo, conlleva a riesgos medioambientales como la deforestación y la pérdida de la biodiversidad. Para justificar estos impactos, es crucial aprovechar los subproductos de la palma. El principal producto del refinamiento del aceite de palma es la oleína, mientras que la estearina, un subproducto sólido y maleable a temperatura ambiente, se utiliza principalmente como aditivo en la producción de margarina para mejorar su firmeza sin alterar sus propiedades nutricionales, debido a su consistencia y menor coste comparado con la hidrogenación. Además, si se considera al aumentar el contenido de FFA en la estearina, se le puede dar un valor agregado significativo, ya que este compuesto es altamente demandado en las industrias cosmética, jabonera, de lubricantes y biocombustibles, diversificando así su uso y mejorando la sostenibilidad del proceso de producción.



Metodología

Se llevó a cabo un diseño experimental central compuesto (CCD) por triplicado y se analizó mediante una RSM. Los factores analizados se presentan en la TABLA I. Se mantuvo constante la temperatura, agitación y pH, y se midió la acidez como variable respuesta usando la norma NTC 218. El proceso de esquematiza en la Fig. 1.

Adicionalmente, se determinó el valor de punto de fusión medido mediante la norma NTC 213 del producto inicial y tratado con las condiciones más apropiadas encontradas.



Fig 2. Diagrama de flujo de la fase experimental

TABLA I NIVELES ESTABLECIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ADECUADOS PARA LA OBTENCIÓN DE FFA

Variable independiente	Valor mínimo	Valor máximo	Centro	Punto de estrella (máximo)	Punto de estrella (mínimo)
Relación agua: aceite (w/w%)	40 %	80 %	60 %	85,74 %	34,25 %
Concentración de enzima (w/w%)	0,05 %	0,3 %	0,175 %	0,335 %	0,014 %
Tiempo de reacción (horas)	2	6	4	6,574	1,426



Resultados

El análisis de RSM del proceso de hidrólisis de aceites utilizando lipasa de *Candida rugosa* resultó en un modelo matemático cuadrático con una acidez máxima predicha de 72.16 % en las condiciones de la TABLA II y una acidez real de 75.59 %. El costo del aceite hidrolizado fue de 9,647.41 COP/kg, en comparación con 3,490.41 COP/kg del aceite sin hidrolizar. Estos resultados demuestran la eficiencia del proceso para incrementar la acidez del producto, lo que justifica su mayor precio debido a sus aplicaciones especializadas en la industria cosmética, jabonera y lubricantes.

TABLA II PARÁMETROS ADECUADOS OBTENIDOS POR EL MODELO PARA LA OBTENCIÓN DE FFA

Factor	Condiciones adecuadas
Concentración enzima (% w/w)	0,32
Tiempo (Horas)	6,57
Agua: sustrato (% w/w)	74,49

TABLA III MÉTRICAS DEL MODELO OBTENIDO

Factor	Valor
R <sup>2</sup>	90,88 %
MAE	3,52
Limite inferior 95 % (% acidez)	64,10 %
Limite superior 95 % (% acidez)	80,82 %

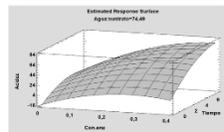
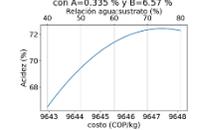
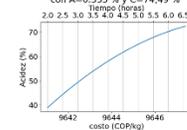


Fig 3. RSM del modelo con concentración de enzima y tiempo para una relación agua: sustrato de 74,49 %

Comparación de costos, variando la relación agua: sustrato, con A=0,335 % y B=6,57 %



Comparación de costos, variando el tiempo, con A=0,335 % y C=74,49 %



Comparación de costos, variando la cantidad de enzima, con B=6,57 horas y C=74,49 %

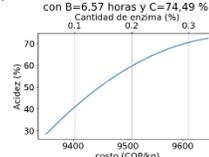


Fig 4. Relación de costos y acidez con la variación de parámetros, donde A: cantidad de enzima (%), B: Tiempo de reacción (Horas) y C: relación agua: sustrato (%)



Objetivos

- Obtener un producto comercializable a partir de la estearina de palma mediante la determinación de condiciones viables del proceso de hidrólisis enzimática.
- Explorar el efecto de la variación de parámetros como concentración de enzima, relación agua/sustrato y tiempo de reacción del proceso de hidrólisis de estearina de palma.
- Determinar las condiciones óptimas de concentración de enzima, relación agua/sustrato y tiempo de reacción del proceso de hidrólisis de estearina de palma.
- Evaluar la viabilidad económica del proceso en los parámetros óptimos, con precios del mercado actual.
- Examinar el producto final en contraste con muestras comerciales, considerando los parámetros de acidez y punto de fusión.

Conclusiones

- La lipasa del hongo *Candida rugosa* es eficaz para aumentar la acidez y producir FFA a partir de estearina de palma, con un modelo predictivo robusto que demostró una excelente capacidad de predicción.
- El análisis identificó las condiciones adecuadas de cantidad de enzima, tiempo de reacción y relación agua para la generación de FFA a partir de estearina de palma con un valor máximo de acidez al 72.46 % predicho y 75.59 % real, validando los resultados con estadística descriptiva y generando un modelo matemático que destaca la influencia de la enzima y el tiempo sobre la cantidad de FFA.
- Se establecieron costos de producción de FFA 9,647.41 COP/kg con hidrogenación y 3,490.41 COP/kg sin hidrogenación para biolubricantes y biocombustibles, considerando la influencia de la relación agua y el tiempo.
- El producto obtenido cumple con las necesidades de la industria de jabones especializados y tiene potencial para surfactantes, biolubricantes y biodiesel, alineándose con las metas del plan nacional de desarrollo (PND) para la reducción de gasto energético, uso eficiente de recursos y disminución del consumo de combustibles fósiles.

Más información sobre el proyecto



DATOS DE CONTACTO DEL AUTOR:

+57 3122419243

miguel19sep@gmail.com

Astolfo2332

www.linkedin.com/in/miguel-lopez-velez