



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA EN QUÍMICA

TESIS

**EVALUACIÓN DE CATÁLISIS HETEROGÉNEA EN LA
DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS
EN ACEITES MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE
GASES**

Para obtener el grado de
Maestro en Química

PRESENTA

Q. Enoch Olvera Ureña

Director

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Codirector

Dr. Jesús Andrés Tavizón Pozos

Mineral de la Reforma, Hgo., México, junio 2024

Número de control: ICBI-AAQ/708/2024

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la Tesis de Maestría titulada **“EVALUACIÓN DE CATÁLISIS HETEROGÉNEA EN LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN ACEITES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES”**, realizada por el sustentante **Enoch Olvera Ureña** con número de cuenta **278255** perteneciente al programa de **Maestría en Química**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 12 de junio de 2024


El Comité Tutorial

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

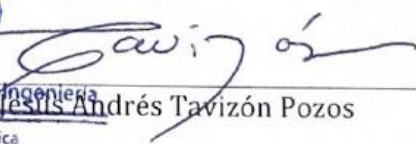

 Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
 Director de Tesis




 Dr. Carlos Andrés Galán Vidal


 Dr. Julián Cruz Borbolla

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
 Área Académica de Química


 Dr. Jesús Andrés Tavizón Pozos

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40088, 40087
 aaq_icbi@uaeh.edu.mx, nandrade@uaeh.edu.mx



Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 1 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en Laboratorio de I+D de Soluciones Químicas Globales, S. de R.L.M.I. como resultado del proyecto CONAHCYT-EFIDT 330053, Investigación y desarrollo de sistemas de control de espuma para la sustentabilidad ambiental de la industria de papel en México.

Parte de este trabajo ha sido presentado en el:

XXXV Congreso Nacional de Química Analítica (2023) con el trabajo “Evaluación de catálisis básica heterogénea en la determinación del perfil de ácidos grasos en aceites mediante cromatografía de gases”.

Parte de este trabajo ha sido presentado en el:

XVIII Congreso Mexicano de Catálisis (2023) con el trabajo “Efecto de la cantidad de estroncio en catalizadores de K/CaO sintetizados a partir de cáscara de huevo para la transesterificación de aceite de canola”.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca No. **821934** otorgada.

Agradecimientos

Agradezco a Denise Quintanar por todo el apoyo brindado durante este tiempo y todo el amor incondicional.

Agradezco a mis padres, Rosalva Ureña y Roberto Olvera por lo mucho que me han dado durante mi vida, educación, consejos y amor.

Agradezco al Dr. José Antonio Rodríguez por haber confiado en mí, por el aprendizaje y la guía recibida durante este trabajo.

Agradezco al Dr. Andrés Tavizón por aceptarme y guiarme en mi formación y trabajo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Jorge López, Angélica Escamilla, Sandra Ramírez, Raybel Muñoz y Begoña Aguilar por acompañarme y aconsejarme en este proceso.

Agradezco a Daniel Texcotitla, Erick Vargas, Xanat Benítez, Fernando Hernández, Sergio González y Alejandro Guajardo por su amistad y confianza en mí.

Agradezco a mi familia, Baruch Olvera, Jonathan Olvera, Diana Ureña, Berenice Cornejo y Cristian Jiménez por el amor recibido.

Agradezco al Dr. Carlos Galán y al Dr. Julián Cruz por su tiempo en el desarrollo y revisión de este trabajo.

Índice de Tablas

Tabla 1	Comparación del perfil de ácidos grasos del aceite de canola y el aceite de girasol	3
Tabla 2	Características físicas del aceite de canola y el aceite de girasol	3
Tabla 3	Diferencias entre las columnas capilares y las empaquetadas	6
Tabla 4	Factores y niveles elegidos para la optimización del diseño tipo Box-Behnken	18
Tabla 5	Sitios básicos totales y fuerza básica de los catalizadores y soporte sintetizados	30
Tabla 6	Valores de relación señal C18:1/estándar interno obtenidos en los distintos experimentos realizados	33
Tabla 7	Análisis de varianza de los modelos, obtenido a partir del diseño de experimentos	34
Tabla 8	Proporción de los ácidos grasos principales presentes en el aceite de oliva analizado por triplicado en días diferentes	38
Tabla 9	Proporción de ácidos grasos obtenidos por la metodología oficial y la metodología propuesta	39
Tabla 10	Proporción de ácidos grasos del aceite de oliva nuevo y usado	41
Tabla 11	Proporción de ácidos grasos del aceite de girasol nuevo y usado	41

Índice de Figuras

Figura 1	Mecanismo de reacción propuesto para la derivatización con BF_3 como catalizador	10
Figura 2	Esquema del mecanismo de reacción superficial de la transesterificación de triglicéridos en tipo LHHW	12
Figura 3	Esquema del mecanismo de reacción superficial de la transesterificación de triglicéridos en tipo Eley-Rideal	12
Figura 4	Curva de calibrado de concentración de ésteres metílicos (%v/v) contra índice de refacción	20
Figura 5	Rendimiento de los soportes sintetizados con distintas relaciones cascarón de huevo/piedra caliza calcinada (25%, 50%, 75% y 100%) con una relación molar metanol/aceite de 12.5, con 7 %p/p de catalizador a 60 °C por 1.5 h en aceite de canola	21
Figura 6	Rendimiento de reacción de los catalizadores adicionados con iones metálicos a 60 °C, relación molar metanol/aceite de 12.5, con 7 %p/p de catalizador por 1.5 h en la reacción de derivatización para el aceite de canola	22
Figura 7	TGA-DTA del soporte a base de cascarón de huevo y los catalizadores Sr/CaO, K/CaO	24
Figura 8	TGA-DTA del catalizador Sr/K/CaO	26
Figura 9	Patrones de DRX del cascarón de huevo calcinado a 800 °C y del soporte a base de cascarón de huevo	27
Figura 10	Patrones de DRX de los catalizadores Sr/CaO, K/CaO y Sr/K/CaO	27
Figura 11	Patrones de DRX del catalizador Sr/K/CaO nuevo y el catalizador tras un ciclo de uso	29
Figura 12	Espectros de infrarrojo del cascarón de huevo calcinado a 800 °C, soporte, catalizadores Sr/CaO, K/CaO y Sr/K/CaO en un número de onda de 4000-400 cm^{-1}	29

Figura 13	Imágenes SEM (aumento x5000) de cascarón de huevo y soporte de CaO, catalizadores Sr/CaO y K/CaO calcinados a 800 °C	31
Figura 14	Imagen SEM (aumento x5000) del catalizador Sr/K/CaO	32
Figura 15	Gráfico de superficie de temperatura y tiempo contra relación señal C18:1/estándar interno	35
Figura 16	Gráfico de superficie de relación molar MeOH/aceite y temperatura contra relación señal C18:1/estándar interno	36
Figura 17	Gráfico de superficie de relación molar MeOH y tiempo contra relación señal C18:1/estándar interno	36
Figura 18	Cromatogramas obtenidos a partir de los valores óptimos encontrados con los gráficos de superficie	37
Figura 19	Comparación del cromatograma obtenido mediante la metodología oficial utilizando BF ₃ como catalizador contra cromatograma obtenido con el catalizador de CaO a condiciones óptimas	38
Figura 20	Cromatogramas de aceite de oliva nuevo y usado a condiciones de análisis óptimas	40
Figura 21	Cromatogramas de aceite de girasol nuevo y usado a condiciones de análisis óptimas	40

Índice

1. Resumen	IX
2. Antecedentes	1
2.1. Lípidos	1
2.2. Importancia de los ácidos grasos	1
2.2.1. Alimentos.....	1
2.2.2. Salud.....	2
2.2.3. Energía.....	2
2.3. Perfil de ácidos grasos	2
2.4. Técnicas instrumentales para determinación del perfil de ácidos grasos..	5
2.5. Derivatización de triglicéridos y ácidos grasos.....	7
2.5.1. Catálisis enzimática.....	8
2.5.2. Catálisis homogénea.....	8
2.5.3. Catálisis heterogénea.....	10
2.5.3.1. Catalizadores de Óxido de Calcio	12
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. Metodología	16
4.1. Síntesis de catalizadores	16
4.2. Caracterización de catalizadores.....	16
4.3. Evaluación catalítica	17
4.4. Diseño de una metodología analítica para la determinación de ácidos grasos.....	18
4.5. Validación de la metodología	18
5. Resultados y discusión	20
5.1. Evaluación de la composición del catalizador.....	20
5.2. Caracterización de catalizadores.....	23
5.2.1. Análisis termogravimétrico	23
5.2.2. Difracción de rayos X.....	26
5.2.3. Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier	28
5.2.4. Índices de Hammett.....	29
5.2.5. Microscopía electrónica de barrido.....	30
5.3. Optimización de las condiciones de reacción	32
5.4. Validación de la metodología	36

6. Conclusiones	41
7. Referencias	43

1. Resumen

Los lípidos son un grupo de compuestos que contienen en su mayoría triglicéridos formados por tres cadenas hidrocarbonadas unidas a un glicerol mediante un grupo éster. Cuando los triglicéridos son hidrolizados se producen diferentes ácidos grasos, la identificación y determinación de la proporción entre ellos es característica de la fuente lipídica. De forma general, este análisis se le conoce como perfil de ácidos grasos y es fundamental en diversas áreas del conocimiento.

Según la ISO 12966 el perfil de ácidos grasos se realiza por cromatografía de gases, sin embargo, es necesario realizar una derivatización, mediante una reacción de transesterificación, para formar ésteres metílicos de ácidos grasos empleando BF_3 en metanol como catalizador. La reacción presenta la desventaja de que el catalizador se emplea únicamente en una ocasión y puede alterar la estructura de los compuestos, por lo que se propone el uso de un catalizador heterogéneo para evitar estas desventajas.

Como alternativa, se propone al CaO como catalizador heterogéneo, ya que es posible obtenerlo de materiales como la piedra caliza o el cascarón de huevo, sin embargo, su actividad no es competitiva con catalizadores homogéneos, por lo que se requiere adicionar iones Sr y K . La evaluación de la composición del soporte y la adición de iones permite proponer un catalizador formado a partir de piedra caliza y cascarón de huevo como fuentes de CaO que contiene Sr y K al 9% p/p de cada uno como la mejor alternativa. Dicho catalizador se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), índices de Hammett, análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X de polvos (DRX). Mediante estos análisis se pudo observar la relación entre la basicidad del material y su actividad catalítica, químicamente está constituido por $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaO , SrCO_3 y $\text{K}_2\text{Sr}(\text{CO}_3)_2$, sin embargo, solamente el CaO presentó actividad catalítica.

Una vez obtenido y caracterizado el catalizador, éste se evaluó en la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos contenidos en aceite de oliva. Las condiciones de reacción: las variables relación molar MeOH /aceite, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y tiempo (h) fueron evaluadas empleando un diseño de Box-Behnken encontrando que la variable con mayor contribución fue el tiempo, y que independientemente del rendimiento de la reacción, la proporción de ácidos grasos encontrado empleado sumatoria de área era equivalente en todos los experimentos. El perfil de ácidos grasos de la muestra fue similar al encontrado empleando la metodología oficial de análisis. Sin embargo, los rendimientos de reacción y tiempo de análisis son mejores empleando catálisis heterogénea.

2. Antecedentes

2.1. Lípidos

Los lípidos pueden clasificarse dependiendo sus propiedades fisiológicas, fisicoquímicas o su estructura, siendo esta última la más general. A partir de estas propiedades se han dividido en lípidos derivados, simples y complejos. Dentro de los derivados se encuentran los ácidos grasos libres y los esteroides, por otro lado, los lípidos simples incluyen a las ceras y acilgliceroles (tri, di y monogliceroles), mientras que los complejos comprenden los fosfolípidos y los glicolípidos [1].

Los aceites vegetales se componen principalmente por ácidos grasos libres y acilgliceroles. Los ácidos grasos libres pueden clasificarse como saturados cuando sólo están presentes enlaces sencillos carbono-carbono (C-C), monoinsaturados cuando hay un enlace doble carbono-carbono (C=C), y poliinsaturados cuando presentan más de un enlace doble [2]. Los ácidos grasos insaturados que se encuentran comúnmente en la naturaleza son en su mayoría de configuración “cis” ya que los ácidos grasos trans se producen como resultado de actividades agrícolas y procesamiento industrial [3]. También se clasifican en cuatro grupos: ácidos grasos de cadena corta (<C6), ácidos grasos de cadena media (C7 a C12), ácidos grasos de cadena larga (C13 a C21) y ácidos grasos de cadena muy larga (>C22) [2]. A partir del número de carbonos presentes en la cadena, se puede diferenciar al ácido graso mediante la posición de los enlaces dobles respecto al metilo terminal, donde ω cuenta como la posición uno. De esta forma, existen tres familias principales de ácidos grasos según la posición del enlace doble: ω -3, ω -6, ω -9 [3].

Por otra parte, los acilgliceroles que componen a un aceite, suelen ser triglicéridos, los cuales están compuestos por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos mediante un enlace éster. Se estructuran por cadenas de carbono que poseen en los extremos un grupo metilo (designado ω) y un grupo carboxilo. El átomo de carbono siguiente al grupo carboxilo se denomina carbono α y el siguiente a este se denomina carbono β y así sucesivamente hasta ω [4].

2.2. Importancia de los ácidos grasos

2.2.1. Alimentos

Los lípidos son biomoléculas fundamentales en los procesos fisiológicos del cuerpo humano y éstos son obtenidos mediante la alimentación de grasas animales y aceites vegetales. Los ácidos grasos provenientes de la alimentación pueden ser usados como fuente de energía y agua, señalización de nutrientes, transportadores de vitaminas y componentes de membranas celulares. Su ingesta

adecuada es necesaria para mantener procesos metabólicos que derivan en la nutrición y salud del ser vivo [4].

2.2.2. Salud

Los lípidos son importantes como nutrientes y como indicadores para defensa de diversas enfermedades [5]. Un desbalance de ácidos grasos puede provocar una considerable variedad de enfermedades, como: inflamación, enfermedades cardiovasculares, diabetes, formación de tumores y Alzheimer [2]. En los últimos años se han añadido ácidos grasos en alimentos para aumentar su valor nutricional, sin embargo, ha resultado en un mayor consumo éstos, el exceso de lípidos en el cuerpo humano afecta la calidad de vida y la salud con enfermedades cardiovasculares o propensión a diabetes. Algunos tipos de ácidos grasos presentan efectos nocivos para la salud del consumidor, como los ácidos grasos insaturados con enlaces dobles de configuración *trans* o los ácidos grasos saturados [6]. Por lo que es necesario conocer y controlar dichos compuestos, una herramienta importante en la producción, calidad y etiquetado nutricional es el perfil de los ácidos grasos ya que informa adecuadamente al consumidor la proporción lipídica en los productos alimenticios [7].

2.2.3. Energía

En los últimos años, los biocombustibles han tomado importancia debido a que son una fuente alternativa menos contaminante en comparación con los combustibles fósiles ya que disminuyen la emisión de óxidos de azufre, material particulado y compuestos nitrogenados como los óxidos de nitrógeno [8]. Particularmente, el biodiesel se puede obtener a partir de los triglicéridos y ácidos grasos libres presentes aceites vegetales frescos, usados o no comestibles, grasas animales o algas. Estos compuestos se transforman en ésteres metílicos de ácidos grasos mediante las reacciones de esterificación y transesterificación en presencia de un catalizador [9].

2.3. Perfil de ácidos grasos

A partir del perfil de ácidos grasos y la metodología usada, se puede conocer de manera exacta o aproximada la cantidad de los analitos en las muestras, biológicas, industriales o alimenticias. Conocer sus composiciones brinda información sobre las características químicas y físicas únicas. Por ejemplo, en la Tabla 1, se comparan los perfiles de ácidos grasos en aceite de canola y girasol.

Tabla 1. Comparación del perfil de ácidos grasos del aceite de canola y el aceite de girasol [10].

	Proporción en aceite de canola (%)	Proporción en aceite de girasol (%)
C14:0	0.06	0.06
C16:0	3.75	5.70
C16:1	0.21	-
C17:0	0.04	0.04
C17:1	-	0.06
C18:0	1.87	4.79
C18:1	62.41	15.26
C18:2	20.12	71.1
C18:3	8.37	0.45
C20:0	0.64	0.30
C20:1	1.54	0.22
C20:2	0.11	0.09
C22:0	0.35	1.16
C24:0	0.27	0.31
C24:1	0.26	0.39

Se puede observar que, al ser aceites provenientes de distintas fuentes, su perfil de ácidos grasos también cambia, por ejemplo, el ácido graso que se encuentra en mayor proporción en el aceite de canola es el ácido oleico (C18:1) mientras que el ácido linoleico está mayoritariamente presente en el aceite de girasol, igualmente, este último contiene una menor proporción de ácidos grasos insaturados (87.57%) en comparación con el aceite de canola (93.02%). Por lo que las diferencias de la presencia y las proporciones de los ácidos proveen de distintas características del aceite de canola al aceite de girasol (Tabla 2).

Tabla 2. Características físicas del aceite de canola y el aceite de girasol [11, 12, 13 ,14, 15].

Parámetros	Canola	Girasol
<i>Densidad (g/cm³)</i>	0.914-0.917	0.918-0.923
<i>Índice de refracción</i>	1.465-1.467	1.474-1.476
<i>Índice de saponificación</i>	188-192	188-192.79

<i>(mg KOH/g aceite)</i>		
<i>Ácidos grasos libres (%)</i>	0.87	2.0
<i>Viscosidad (mPa/s, 35 °C)</i>	42.49	41.55

Los dos aceites proveen de características físicas y químicas diferentes, por ejemplo, el aceite de canola contiene menor cantidad de ácidos grasos libres, mientras que el aceite de girasol presenta una mayor densidad. Estas características permiten emplear a los aceites en distintas áreas. El aceite de girasol es utilizado en la industria alimentaria para la fabricación de margarina, de igual forma se emplea en la síntesis de lubricantes y tintas oleosas [16]. Por otro lado, el aceite de canola se usa ampliamente en la industria alimentaria como en la producción de mayonesas y margarinas, en procesos de fritura debido a su capacidad antioxidante [17].

El perfil de ácidos grasos es una herramienta en el análisis de alimentos, ya que resulta útil en la quimiotaxonomía. Se han descrito casos donde las diferencias significativas de ácidos grasos o su composición detectadas mediante el perfil, ayuda a identificar distintas especies, e incluso cepas de microorganismos útiles en la industria alimentaria como la *S. cerevisiae* utilizada en la fermentación de cerveza, pan, vino y kumis o la *Kluyveromyces thermotolerans* que solo se emplea en la producción de vino y cerveza [18]. Por otra parte, el perfil de ácidos grasos se aplica en la detección de los ácidos grasos volátiles libres que se encuentran presentes en pequeñas cantidades en los productos lácteos, ya que su nivel aumenta durante la maduración y afecta las propiedades organolépticas de los productos y propicia la rancidez [19].

A partir del perfil de ácidos grasos se ha demostrado que un aumento en la cantidad de ácido adrenico (C22:4 n-6) en la materia gris de la región cerebral y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) en la región parietal puede ser un indicador para el diagnóstico de Alzheimer [20]. De igual forma, se ha descrito que el aumento de los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico en plasma puede conducir a diabetes tipo II. Por otro lado, el decremento de los ácidos araquídico (C20:0), behenico (C22:0) y lignocérico (C24:0) pueden derivar en fallas cardíacas [21].

El perfil de ácidos grasos contribuye en la identificación y análisis de la composición del biocombustible [22]. De esta manera se puede tomar decisiones para la elección del catalizador y condiciones del proceso. Asimismo, aporta información para el control de calidad de biodiesel y correlacionar sus propiedades fisicoquímicas con su composición [23].

2.4. Técnicas instrumentales para determinación del perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos se puede analizar mediante técnicas instrumentales ópticas como la resonancia magnética nuclear, la espectroscopía ultravioleta-visible, la espectroscopía de infrarrojo y la espectroscopía Raman, de igual forma pueden ser analizadas mediante técnicas de separación como electroforesis capilar, cromatografía de gases o cromatografía de líquidos. Las técnicas espectroscópicas presentan la ventaja de tiempos de análisis cortos y menor complejidad de operación que las metodologías de separación. No obstante, debido a que las técnicas espectroscópicas no poseen la sensibilidad de las técnicas de separación, y de que estas últimas son capaces de detectar y cuantificar muestras lipídicas complejas, se prefiere el uso de técnicas de separación instrumental [24].

La electroforesis capilar es capaz de analizar ácidos grasos mediante distintas modalidades como la electroforesis capilar de zona y la cromatografía electrocinética micelar a partir de ciclodextrinas. Esta técnica presenta algunas ventajas en comparación con las técnicas cromatográficas, ya que no requiere el uso de columnas específicas y presenta tiempos de análisis cortos (20 min). Sin embargo, requiere altos voltajes de operación (>20 kV) y el uso de ciclodextrinas, que incrementan el costo del análisis [25].

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica apta para la determinación de ácidos grasos, siendo la modalidad de fase inversa la más aplicada actualmente, donde la retención de los ácidos grasos depende de la polaridad de la fase estacionaria, la fase móvil y la estructura química de los analitos [26, 27]. Esta técnica presenta una sensibilidad adecuada para el análisis del perfil de ácidos grasos y permite analizarlos sin la necesidad de altas temperaturas que puedan cambiar la composición de los analitos. Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados con enlaces dobles conjugados solo pueden ser identificados mediante la combinación de derivatización, separación y la detección por espectrometría de masas [28].

El perfil de ácidos grasos de triglicéridos y ácidos grasos libres se realiza principalmente por cromatografía de gases (GC) ya que la norma ISO 12966-4 describe esta técnica para el análisis de ácidos grasos desde C8 hasta C24, incluyendo ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en configuración *cis* y *trans*. Este método se puede aplicar a grasas y aceites animales o vegetales. La cromatografía de gases brinda alta sensibilidad y reproducibilidad, así como la caracterización de muestras complejas mediante la separación por la

columna [29, 30]. La separación de los ácidos grasos se lleva a cabo en la columna, la selección de sus características como la longitud, platos teóricos o polaridad conllevará a una mejor separación.

Las columnas empaquetadas fueron ampliamente usadas en análisis alimenticios y siguen siendo aptas para algunos análisis. Cabe señalar que muestras más complejas requieren una mayor resolución que la que puede ofrecer la columna empaquetada [19]. Actualmente las columnas capilares son más utilizadas en este tipo de análisis ya que presentan mayores longitudes y un menor diámetro, lo que permite una mejor separación y el aumento de platos teóricos mejora la resolución, siendo superior que las columnas empaquetadas, como se muestra en la Tabla 3 [31, 32].

Tabla 3. Diferencias entre las columnas capilares y las empaquetadas [33].

<i>Columnas</i>	Capilares	Empaquetadas
<i>Longitud (m)</i>	10-100	1-6
<i>Diámetro interno (mm)</i>	0.1-0.75	2-4
<i>Platos teóricos</i>	10-400x10 ³	1-10x10 ³

Las columnas capilares se han empleado en diversos estudios como en la determinación de ácidos grasos en arbustos de la familia *Echium* donde se utilizaron las columnas SP-2330 acoplada a un detector de ionización en llama y HP-1 de metil silicona acoplada a espectrometría de masas [34], por otro lado, las columnas DB-WAX y CP WAX 52 CB se emplearon para el análisis de ácidos grasos en grosella y semillas de pino respectivamente [35, 36]. Adicionalmente, las columnas polares, como la CP-Sill 88, HP-88 y SP-2560 se han empleado en la determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos provenientes de alimentos, obteniendo mejores resultados de la columna CP-Sill 88, ya que no presenta problemáticas en la determinación de isómeros geométricos [37, 38].

Los compuestos analizados por cromatografía de gases pueden ser detectados por espectrometría de masas (MS), este es utilizado debido a su alta selectividad y sensibilidad para la detección y cuantificación de muestras complejas que incluyen trazas, especialmente cuando no se cuenta con estándares, ya que permite la identificación de compuestos mediante la relación masa-carga (m/z) y las abundancias relativas de iones moleculares y fragmentados, que son formados a partir de la ionización electrónica [39]. La combinación de ambas técnicas provee al análisis de la alta resolución de la cromatografía de gases y la alta sensibilidad de la espectrometría de masas, sin embargo, el uso de este detector aumenta considerablemente el costo de adquisición, mantenimiento y operación del equipo,

por lo que no todos los laboratorios de análisis pueden costearlo [5]. La espectrometría de masas se ha empleado en la determinación de ácidos grasos de la *Sedum sediforme*, obteniendo una composición mayoritaria de ácido palmítico (28.8%), igualmente se obtuvieron las composiciones de las semillas de granada (76.57% de ácido punícico, 6.47% de ácido catálpico y 1.45% de ácido eloteárico), aceites de bayas (ácido palmítico de 23–40%, el ácido oleico de 20–53% y el ácido palmitoleico de 11–27%) y bayas de goji (47.5% de ácido hexadecanoico, 9.1% de ácido linoleico y 4.2% de ácido mirístico) [40, 41, 42]. Por otro lado, el detector de ionización de llama (FID) es el método tradicional y oficial empleado para la detección de ácidos grasos, ya que presenta buena sensibilidad (10^{-13} g/s), precisión y linealidad en un amplio rango de concentraciones, ya que, el detector responde al número de átomos de carbono que pasa por el detector en un tiempo determinado, lo que le brinda mayor sensibilidad a la masa que a la concentración [33]. La cuantificación de los analitos se determina mediante las áreas de pico y el costo de adquisición y operación son menores a la espectrometría de masas [5, 32]. Se ha descrito el uso del FID para diversas muestras lipídicas como extracto de semillas de chabacano, obteniendo una composición principal de ácido 9,12-octadecadienoico (51,6%), ácido hexadecanoico (23,0%) y ácido octadecanoico (10,6%), espinos amarillo encontrando predominancia de ácidos grasos monoinsaturados y semillas de papaya que presentaron entre 70-78% de ácidos grasos insaturados [5]. Debido a la naturaleza compleja del analito no es conveniente inyectarlos de forma directa al equipo y es necesario realizar una derivatización, es decir, adecuar los compuestos previamente a su análisis mediante la modificación de sus estructuras, transformando a los ácidos grasos en ésteres metílicos, ya que estos son adecuados para el análisis [5]. La derivatización que se emplee modificará los parámetros de sensibilidad y selectividad de la técnica y el detector que se deseen emplear [28, 43].

2.5. Derivatización de triglicéridos y ácidos grasos

Una forma de derivatizar ácidos grasos libres es mediante la reacción de esterificación de Fischer, que consiste en la reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol para generar un éster metílico de ácido graso y agua. Esta reacción se desarrolla rápidamente en presencia de un catalizador ácido como el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, o el ácido *p*-toluensulfónico [44]. Esta técnica logra rendimientos competentes en periodos cortos (1-4 h) y puede realizarse con distintos catalizadores homogéneos ácidos y básicos, heterogéneos ácidos y básicos y enzimáticos [45].

Por otro lado, la reacción de transesterificación de triglicéridos es el proceso de derivatización comúnmente empleado en el análisis de aceites con menor cantidad

de ácidos grasos libres. Dicha reacción se lleva a cabo al hacer reaccionar un triglicérido con tres moléculas alcohol de cadena corta para formar tres ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol. Al igual que las reacciones de esterificación, esta reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador ya sea homogéneo, heterogéneo o enzimático [29].

2.5.1. Catálisis enzimática

La aplicación de enzimas como agentes derivatizantes presenta ventajas en comparación con los catalizadores homogéneos, ya que implica el uso de condiciones de temperatura suaves, pH neutros, medios acuosos y son reutilizables. Sin embargo, suelen ser sensibles a la polaridad del medio, su costo es alto y son sensibles a cambios de temperatura [46].

Las enzimas como las lipasas son utilizadas en las reacciones de esterificación para ácidos grasos en condiciones de reacción variables. Algunas de ellas son *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium*, *Candida antarctica* y *Candida rugosa* [45]. Sin embargo, en reacciones de transesterificación suelen requerir tiempos de reacción prolongados, uso de solventes o más de una enzima como catalizador, todas estas técnicas se han desarrollado con el objetivo de mejorar su actividad catalítica. Se ha descrito la reacción de aceite de soya empleando Lipozyme TL IM, obteniendo rendimientos de 35% en 12 h, mientras que, el uso de hexano en la transesterificación de aceite de castor empleando la misma enzima durante 6 h resultó en un rendimiento de 98%. Por otro lado, la combinación de Lipozyme TL IM (3.9%), Lipozyme RM IM (1.7%) y Novozym 435 (8%) en reacción con aceite de oliva durante 18 h dio lugar a rendimientos de 95% [47]. Adicionalmente, esta técnica también presenta el inconveniente de la inhibición de las enzimas por los alcoholes de cadena corta como lo es el metanol y por el glicerol que es un producto secundario. La inhibición a partir de estos dos compuestos se ha estudiado anteriormente empleando lipasas *Candida* sp.99-125 y Novozym 435 en aceite de soya. Los resultados mostraron que el metanol inhibe a la enzima aproximadamente a los 10 minutos, mientras que el glicerol la inhibe a partir de 120 minutos, los rendimientos de reacción no superaron el 5% bajo estas condiciones [48, 49].

2.5.2. Catálisis homogénea

Los catalizadores homogéneos para esterificación y transesterificación suelen ser ácidos y bases inorgánicas como BF_3 , H_2SO_4 , HCl , NaOH o KOH . Son muy eficientes ya que no presentan limitantes de transferencia de materia y son accesibles comercialmente [2]. Los catalizadores ácidos son capaces de llevar a cabo reacciones de esterificación y transesterificación simultáneamente en medios acuosos obteniendo altos rendimientos en cortos periodos de tiempo, como es el

caso del H_2SO_4 , que se empleó en la producción de ésteres metílicos a partir de aceite de alga *Chlorella pyrenoidosa* que contenía 90% de agua en el medio, obteniendo rendimientos de 93.2% a 120 °C durante 180 minutos sin presentar dificultades por la presencia de agua. Por otro lado, el HCl se ha empleado en la transesterificación de aceite de soya obteniendo rendimientos de 94% a 100 °C durante 1 h, siendo estos los catalizadores homogéneos más empleados ya que se pueden obtener buenos resultados y son más económicos que el H_2SO_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ [50].

Particularmente, el uso de BF_3 para la derivatización por medio ácido es considerada la metodología oficial según la ISO 12966-2. de forma comercial se puede obtener BF_3 /metanol como reactivo y los tiempos de reacción que van desde los 2 minutos para las reacciones de esterificación hasta los 90 minutos para las reacciones de transesterificación a 100 °C. Se han descrito modificaciones a la metodología oficial, logrando conversiones de hasta 65 % en ácidos grasos con enlaces dobles. Sin embargo, existe la probabilidad de que el catalizador reacciones con dichos enlaces, formando ácidos grasos saturados, dando como resultado un análisis erróneo. El BF_3 reacciona particularmente con los enlaces dobles de los ácidos monoinsaturados y principalmente poliinsaturados, aumentando las pérdidas en función del tiempo y la concentración [51, 52]. En la Figura 1 se muestra el mecanismo de reacción del reactivo BF_3 /metanol.

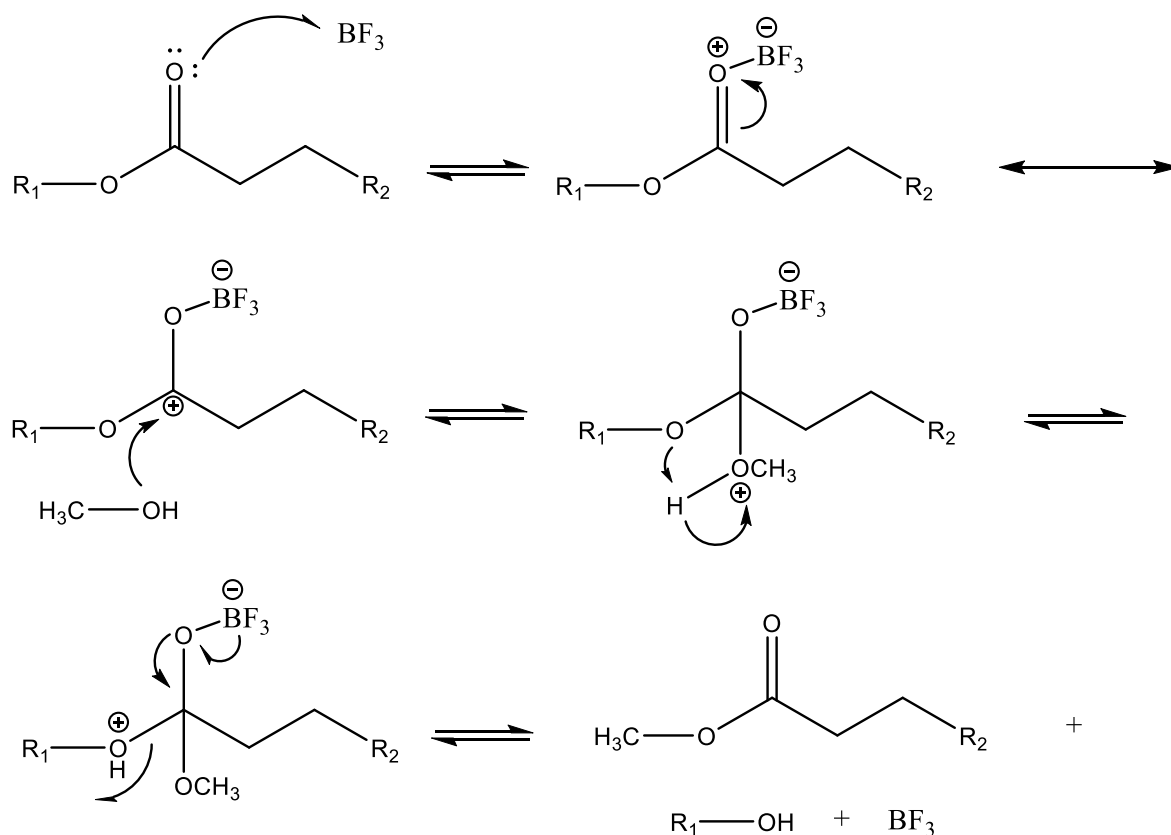


Figura 1. Mecanismo de reacción propuesto para la derivatización con BF_3 como catalizador (donde R_1 es el grupo glicerol y R_2 la cadena hidrocarbonada).

En esta reacción de transesterificación el BF_3 actúa como un ácido de Lewis, el par de electrones del oxígeno del carbonilo ataca al boro para formar un enlace, posteriormente el oxígeno del metanol ataca al carbono que se encuentra con carga positiva para realizar una reacción de sustitución, formando un éster metílico y como subproducto glicerol.

Por su parte, los catalizadores básicos no presentan problemas de isomerización del enlace doble, además de proporcionar buenos rendimientos y pureza en cortos periodos de tiempo. Los hidróxidos metálicos como NaOH y KOH son los más empleados, al igual que el CH_3ONa , CH_3OK y NaOC_2H_5 . Se ha descrito el uso de NaOH en condiciones suaves de reacción (65°C , 7.5 relación MeOH /aceite y 0.13g de catalizador por 1 h) obteniendo 70% de rendimiento [53]. Por otro lado, el KOH alcanzó rendimientos de 94% empleando cebo de res a 70°C durante 35 minutos con una relación molar 1/6 con 0.5% de catalizador [54].

No obstante, estos catalizadores no son adecuados para derivatizar ácidos grasos libres ya que pueden llevar a cabo la saponificación en presencia de agua [2]. A pesar de presentar rendimientos altos, el uso de catalizadores homogéneos supone un problema para su reutilización ya que son difíciles de recuperar para ser usados en más de un proceso además de ser tóxicos y corrosivos [55].

2.5.3. Catálisis heterogénea

Con el objetivo de reutilizar el catalizador en reacciones posteriores, se ha propuesto el uso de catalizadores sólidos para el proceso de derivatización. De igual manera, existen catalizadores ácidos y básicos, a pesar de que son menos activos que los homogéneos debido a las limitantes de transferencia de materia, no son tóxicos ni corrosivos y pueden recuperarse fácilmente y reutilizarse en más de un ciclo [55]. Se ha planteado la combinación de diversos materiales con distintas propiedades físicas y químicas para mejorar los rendimientos de reacción, como es el caso de los catalizadores ácidos $\text{SO}_4/\text{Mg-Al-FeO}_3$ que se empleó en la transesterificación de aceite de cocina usado, obteniendo rendimientos de 98.5% a 95°C por 5 h con una relación molar 9/1 y el $\text{SO}_4^{2-}/\text{ZrO}_2$ que reaccionó con aceite de soya obteniendo rendimientos superiores al 90% con una relación molar 20/1 en una temperatura de 100°C por 4 h [56, 57].

Por otro lado, los catalizadores básicos constan de óxidos metálicos, sales, resinas de intercambio y zeolitas. Dentro de los más estudiados están los óxidos de metales alcalinotérreos, como MgO , CaO , SrO o BaO ya que pueden ser obtenidos fácilmente de fuentes naturales lo que los vuelve económicos y accesibles [58, 59], por ejemplo, el catalizador MgO/UREA-800 que mostró un buen desempeño en la

formación de ésteres metílicos a partir de aceite de castor obteniendo rendimientos de 96% en condiciones suaves de reacción (relación molar de 12/1, 75 °C durante 1 h) y el β -Sr₂SiO₄ que catalizó la reacción de aceite de microalga con una relación molar de MeOH/aceite de 12/1 durante 104 minutos a 65 °C con rendimientos de 97% [60, 61].

En general, los sitios activos superficiales de los catalizadores básicos son grupos terminales M⁺ y O⁻ que se encuentran en los bordes de los cristales que actúan como ácidos y bases de Lewis, respectivamente [62]. De esta forma se puede llevar a cabo la reacción superficial por el mecanismo tipo Langmuir-Hishelwood-Hougen-Watson (LHHW) o Eley-Rideal que se esquematizan en las Figuras 2 y 3, respectivamente [63].

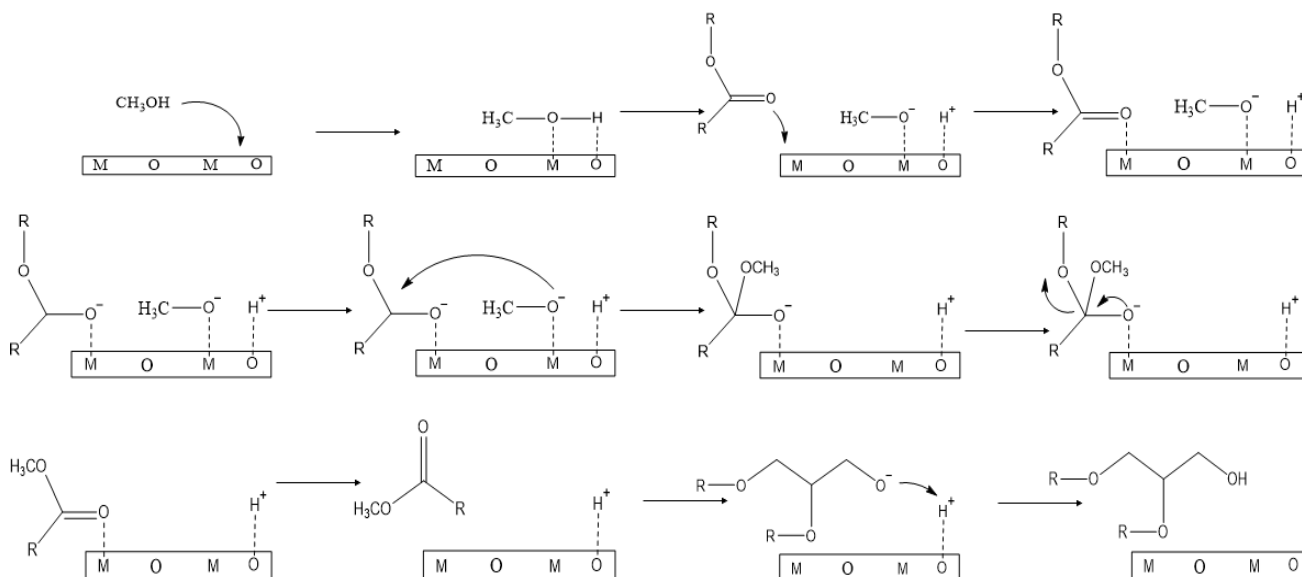


Figura 2. Esquema del mecanismo de reacción superficial de la transesterificación de triglicéridos en tipo LHHW.

En este mecanismo, la metanólisis se lleva a cabo por el carácter básico del grupo O⁻, que al ser un nucleófilo forma al grupo metóxido que se adsorbe en M⁺. Luego, el triglicérido se adsorbe en otro sitio ácido M⁺ por medio del oxígeno del carbonilo. El metóxido formado ataca al carbono de carbonilo para formar un éster metílico [63].

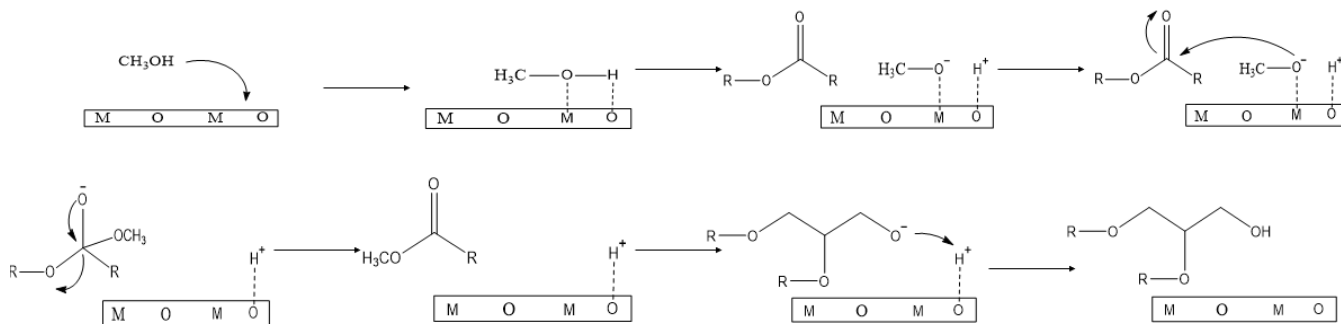


Figura 3. Esquema del mecanismo de reacción superficial de la transesterificación de triglicéridos en tipo Eley-Rideal.

El mecanismo Eley-Rideal no involucra a la adsorción del triglicérido en el sitio metálico [64]. El metanol lleva a cabo la metanolisis y posteriormente ataca al triglicérido para formar eventualmente los ésteres metílicos de ácidos grasos y el glicerol. Estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente durante la reacción de transesterificación y dependen de la disponibilidad y fuerza de los sitios ácidos y básicos superficiales.

2.5.3.1. Catalizadores de Óxido de Calcio

El óxido de calcio (CaO) es un buen candidato como catalizador sólido ya que es abundante en la naturaleza, su producción es sencilla, económica, y se ha utilizado previamente en reacciones de formación de biodiesel [65]. En comparación al BF_3 , el CaO presenta alta actividad catalítica optimizando los tiempos de reacción y disminuye la temperatura de operación evitando el uso de grandes cantidades de catalizador [66]. El CaO puede obtenerse de piedra caliza y de materiales formados por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o CaCO_3 como cascarón de huevo, huesos, conchas marinas y residuos de construcción [67, 68]. catalizadores de CaO se sintetizan a partir de CaCO_3 , que al calcinarse a 800-1000 °C se forma CaO. La formación de CaO a partir de CaCO_3 libera CO_2 , este compuesto es eliminado ya que el aumento de la temperatura descompone los carbonatos desde el exterior hacia el interior del sólido, de esta forma se genera una superficie porosa de CaO [69]. Particularmente, el cascarón de huevo es un desecho de las industrias alimenticias y restaurantera lo que lo vuelve económico y abundante y tiene una composición del 71.80% de CaCO_3 . Adicionalmente, contiene magnesio, azufre, fósforo, potasio y sodio en su composición, lo cual podría contribuir a la basicidad de los sitios activos [70].

De manera general, se ha descrito que los catalizadores de CaO presentan una

reactividad aceptable en la reacción de transesterificación de triglicéridos. No obstante, el CaO no se considera un catalizador competitivo con los catalizadores homogéneos como el BF_3 o el NaOH, que alcanzan rendimientos del 65% y 94% respectivamente [52, 71]. Por otro lado, el CaO alcanza rendimientos de 40% en 5 horas usando aceites vegetales como material de partida [72]. Por esta razón se ha planteado el aumento del carácter básico al mezclarse con otros óxidos alcalinos o alcalinotérreos [55, 73].

El uso de metales alcalinos adicionados al CaO también resulta en una opción viable, como el caso del óxido de potasio (K_2O), ya que al adicionarse al CaO la mezcla presenta un aumento en la basicidad [74] y, por lo tanto, un catalizador competitivo en la transesterificación ya que el K_2O funciona como un óxido básico. El potasio se ha impregnado en CaO a partir de KNO_3 , el catalizador fue calcinado a $600\text{ }^\circ\text{C}$ para reaccionar con aceite de canola, obteniendo rendimientos superiores al 90% en condiciones de $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 3 horas [75]. Por otra parte, la adición de KF en catalizadores a base de CaO forma estructuras de KCaF_3 que presentan mayor actividad que el CaO en la reacción de transesterificación de aceite de puerro chino, ya que el flúor es más electronegativo, aumenta la acidez del Ca^{2+} , que atrae con mayor fuerza al CH_3O^- [74]. A pesar de poseer una buena actividad catalítica, los catalizadores de CaO adicionados con potasio carecen de estabilidad y se lixivian fácilmente, por lo que su actividad se ve reducida y el potasio estaría disuelto en el medio, actuando como catalizador homogéneo [76, 77].

Por su parte, el óxido de estroncio (SrO) presenta mayor basicidad que el CaO, además de ser completamente insoluble en medios acuosos, sin embargo, posee una superficie relativamente baja, por lo que afecta su actividad [78, 79]. Se ha propuesto la combinación de CaO y SrO para aumentar la basicidad. Por otro lado, el CaO y el SrO presentan una alta basicidad y sus propiedades pueden presentar una mayor actividad si se combinan, ya que el SrO posee mayor resistencia básica y densidad de sitios activos que Mg y CaO, lo que lo hace selectivo para reacciones de transesterificación, además de proveer estabilidad al catalizador y reducir la lixiviación [9, 80]. El SrO anteriormente ha sido adicionado a soportes de CaO en reacciones de transesterificación de aceites vegetales como el aceite de palma y aceite de jatrofa, alcanzando rendimientos de 98% [80].

En años recientes la adición de estos iones metálicos en soportes de CaO formados principalmente por desechos ha presentado buenos resultados como es el caso del K_2O formado a partir de KOH, se ha adicionado a un soporte de CaO proveniente de cascarón de huevo, siendo utilizado para reacciones de transesterificación de aceite de soya usado, alcanzando rendimientos superiores al 90% [81]. Por otro lado, la adición de Sr a dicho soporte para reacciones de transesterificación de aceite de jatrofa, obtuvo rendimientos entre 88% y 99% [82]. Adicionalmente, ambos iones, Sr y K, provenientes de SrCO_3 y K_2CO_3 se impregnaron en un soporte de

CaO proveniente de conchas de mar calcinadas. Este catalizador presentó rendimientos de 80.67% en la reacción de transesterificación de aceite de canola [83].

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar el perfil de ácidos grasos a través del análisis de ésteres metílicos obtenidos por transesterificación empleando catálisis heterogénea para su aplicación en muestras de aceites.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar, caracterizar y evaluar catalizadores basados en CaO para su aplicación en la obtención de ésteres metílicos a partir de aceites.
- Diseñar una metodología de análisis cromatográfico para la determinación del perfil de ácidos grasos en aceites.
- Validar la metodología propuesta para su aplicación en el análisis de muestras reales.

4. Metodología

4.1. Síntesis de catalizadores

El soporte de CaO se sintetizó a partir de cáscaras de huevo obtenidas de forma casera. Se limpiaron con agua y se calcinaron a 800 °C por 4 h para transformar el CaCO₃ en CaO. Luego, la cáscara de huevo calcinada se combinó con piedra caliza calcinada obtenida de una tienda de construcción en concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 % p/p. Por cada gramo de mezcla se adicionó un mililitro de metanol (J.T. Baker) y se mezclaron vigorosamente a 60 °C durante media hora. Después se dejaron macerar por 12 h a 60 °C para secarlos y transcurrido este tiempo se realizó una segunda calcinación a 800 °C por 4 h.

Se sintetizaron catalizadores de K/CaO, Sr/CaO y Sr/K/CaO. Como sales precursoras se utilizó nitrato de estroncio (Sr(NO₃)₂, Meyer) y nitrato de potasio (KNO₃, CTR Scientific). La concentración de Sr y K fue de 9 %p/p en todos los catalizadores [9]. En el catalizador bimetálico se impregnaron simultáneamente. Para sintetizar los catalizadores, la cantidad necesaria de sal se diluyó en 10 ml de metanol a 60°C y se agregó CaO (cáscara de huevo y piedra caliza calcinada). Las sales y el soporte se mezclaron con agitación constante por 30 min y se dejaron macerar por 12 h. Luego se calcinaron a 800 °C por 4 h [9].

4.2. Caracterización de catalizadores

Los catalizadores sin calcinar se caracterizaron por análisis termogravimétrico (TGA-DTA) usando un TA Instruments SDT Q600 en N₂ de temperatura ambiente a 900 °C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min. Por otra parte, los catalizadores calcinados se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) usando un difractómetro Philips X'pert Pro con fuente de radiación Cu K α (40 kV, 30 mA) con una longitud de onda de 0.154 nm. Los análisis de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) se llevaron a cabo en un espectrómetro Perkin-Elmer GX 59750 en pastilla de KBr en un intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹.

Los sitios básicos totales de los catalizadores se determinaron mediante valoración por retroceso. Se pesaron alrededor de 0.0125 g de cada catalizador y se secaron a 120 °C por 12 h antes del análisis. Una vez secos, se añadieron 25 mL de una solución de ácido benzoico al 0.05 N en benceno. La mezcla se agitó por 30 min y se dejó reposar. Luego, la fase líquida se separó y el sólido se limpió con 5 mL de benceno. Posteriormente, la fase líquida y el benceno de enjuague se combinaron y se valoraron con una solución de NaOH 0.2 N en metanol usando azul de bromotimol al 0.04 % como indicador. La cantidad de sitios básicos se calculó de acuerdo con la Ecuación 1.

$$meq\ g^{-1}\ NaOH = \frac{V_{A.Benzoico}[A.Benzoico] - V_{NaOH}[NaOH]}{m_{catalizador}} \quad (Ec. 1)$$

Donde $V_{A.Benzoico}$ es el volumen de ácido benzoico en mililitros, $[A.Benzoico]$ es su concentración normal, V_{NaOH} el volumen de la solución valorante en mililitros, $[NaOH]$ su concentración normal y $m_{catalizador}$ como la masa del catalizador expresada en gramos. La fuerza básica de los sólidos calcinados se llevó a cabo con Indicadores de Hammett siendo amarillo de alizarina ($pK_a=10.7$), fenolftaleína ($pK_a=9.1$) y azul de bromotimol ($pK_a=7.1$). Anterior al análisis, los sólidos se secaron a $120\text{ }^\circ\text{C}$ por al menos 12 h. Se pesaron 10 mg de sólido y se mezclaron con 2 mL de una solución de indicador al 1 % en benceno. El recipiente permaneció tapado por 2 h y se registró el cambio de color del sólido. La microscopía electrónica de barrido de los catalizadores se realizó en un equipo JEOL's HR* modelo JSM-IT710HR, con un voltaje de 30.0 kV. Las muestras se recubrieron con película de oro para su análisis. Posteriormente, se realizaron observaciones superficiales de las muestras en acercamientos de x2000 y x5000.

4.3. Evaluación catalítica

La evaluación catalítica se realizó con aceite de canola comercial. El sistema de reacción consistió en un matraz balón de fondo plano de una boca acoplado a un refrigerante, el sistema fue agitado magnéticamente y calentado por resistencia. Anterior a la reacción, el catalizador se secó a $120\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h. Después, 0.49 g de catalizador seco se combinó con 4.1 mL de metanol en reactor a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min y posteriormente se adicionan 7 g de aceite y se dejaron reaccionar por 1.5 h. Estas cantidades de metanol y aceite corresponden a una relación molar metanol/aceite=12.5 considerando el peso molecular del aceite de 876.6 g/mol, ya que es el promedio de las proporciones de ácidos grasos presentes en el aceite de canola [84] y una carga de catalizador del 7 %p/p respecto al aceite. Después del tiempo de reacción la mezcla se coloca en un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó a más de 2500 rpm por 10 min para separar las fases líquidas de la sólida. Posteriormente, las fases líquidas se pasaron a un embudo de separación y se dejaron reposar para su separación por gravedad. La fase superior correspondió a la fase polar del glicerol formado y el metanol no reaccionante, mientras que la fase inferior, la fase oleosa, formada por los ésteres metílicos y al aceite sin reaccionar, las fases se separaron haciendo lavados con hexano y agua. Por último, el rendimiento de la reacción se determinó a partir del índice de refracción de los ésteres metílicos contenidos en la fase oleosa mediante interpolación en una curva de calibrado construida a partir de estándares de ésteres metílicos en aceite (0, 20, 40, 60, 80 y 100 %p/p), el índice de refracción se midió en un refractómetro Abbe modelo WYA-2WAJ con rango de $0-95^\circ$ brix [85].

4.4. Diseño de una metodología analítica para la determinación de ácidos grasos

La reacción de transesterificación depende de diferentes variables experimentales asociadas a las condiciones experimentales, la relación molar MeOH/aceite, la temperatura y el tiempo de reacción son las que tienen una mayor contribución [67]. Con la finalidad de seleccionar las condiciones óptimas, se realizó un diseño de experimentos de superficie de respuesta tipo Box-Behnken para optimizar las variables mencionadas. La Tabla 4 muestra los niveles seleccionados de cada una de las variables. Considerando que el ácido oleico (C18:1) es el ácido graso que se encuentra en mayor proporción en el aceite de oliva [86], se seleccionó como variable de respuesta la relación de áreas señal C18:1/estándar interno.

Tabla 4. Factores y niveles elegidos para la optimización del diseño tipo Box-Behnken.

Factor	-1	0	1
Relación molar MeOH/aceite	10.0	12.5	15.0
Temperatura (°C)	50.0	50.0	70.0
Tiempo (h)	0.5	1.0	1.5

Las reacciones de derivatización de aceite de oliva comercial se realizaron en una ampollita de vidrio de 5 mL a la que se le adicionó el catalizador, metanol y aceite. Previo a la reacción, el catalizador se secó por 12 h a 120 °C para eliminar humedad adsorbida. La ampollita se selló y se introdujo a un horno precalentado a la temperatura seleccionada previamente. Una vez terminadas las reacciones de derivatización se pudieron observar tres fases, una superior (polar), intermedia (oleosa) e inferior (sólida), los ésteres metílicos están contenidos en la fase intermedia. Posteriormente se prepararon las soluciones a inyectar en el cromatógrafo mezclando 40 µL del extracto de ésteres metílicos y 400 µL de la solución de estándar interno (naftaleno 100 mg/L en hexano).

Las soluciones fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases acoplado a FID con una columna SGE-BPX70 que contiene una fase estacionaria del 70% de cianopropilpolisilfenilosiloxano. La rampa de temperatura fue de 5°C/min desde 50 °C hasta 220 °C con un tiempo de análisis cromatográfico total de 44 min.

4.5. Validación de la metodología

Considerando que la cuantificación se realiza mediante sumatoria de área, la validación se centra en la determinación de la precisión y la exactitud. En el caso de

la precisión, se analizó una muestra de aceite de oliva tres veces en días diferentes. Mientras que la exactitud, se realizó mediante comparación de los resultados obtenidos mediante el catalizador a base de CaO con la metodología oficial descrita en la ISO 12966-2, se realizó la derivatización del aceite de oliva empleando el catalizador BF₃/Metanol.

De acuerdo con la norma ISO 12966-2, se pesó 0.5 g de aceite de oliva y se adicionó a un matraz balón junto con 6 mL de NaOCH₃, se dejó reaccionar por 5 minutos a reflujo con agitación contante, este paso se realizó para eliminar la materia saponificable. Al finalizar el tiempo se agregaron 7 mL del reactivo BF₃/metanol y se dejó a reflujo por 10 minutos más, al terminar la reacción se realizó un lavado con 6 mL de hexano y 10 mL de una solución saturada de NaCl y el contenido se traspasó a una probeta y se dejó reposar con el objetivo de separar los productos de reacción. Posteriormente, se tomaron 40 µL y se mezclaron con 400 µL de la solución de estándar interno y se inyectó en el cromatógrafo de gases a las condiciones mencionadas anteriormente. Adicionalmente, la muestra fue analizada por un laboratorio externo certificado donde se emplea la metodología ISO 12966-2.

Adicionalmente se evaluó la actividad del catalizador en la derivatización de aceites de oliva y girasol usados. Estas reacciones se llevaron a cabo a las condiciones óptimas de la metodología propuesta. Posteriormente, los compuestos derivatizados fueron inyectados en el cromatógrafo de gases a las condiciones de análisis descritas anteriormente. Los cromatogramas obtenidos se compararon con sus aceites nuevos respectivamente.

5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación de la composición del catalizador

En la Figura 4, se presenta la curva de calibración obtenida a partir de mezclas de ésteres metílicos/aceite de canola. Los ésteres metílicos se sintetizaron a partir de la metodología que emplea NaOH como catalizador a 60 °C por 1 hora [71]. Los puntos de la curva de calibrado se prepararon adicionando un contenido de 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de ésteres metílicos y las mediciones se realizaron por triplicado. La curva presentó una $R^2=0.9907$ y la ecuación de la curva de calibrado se ajusta a la siguiente ecuación: Índice de Refracción= $-0.0229[\text{Ésteres metílicos}] + 1.471$.

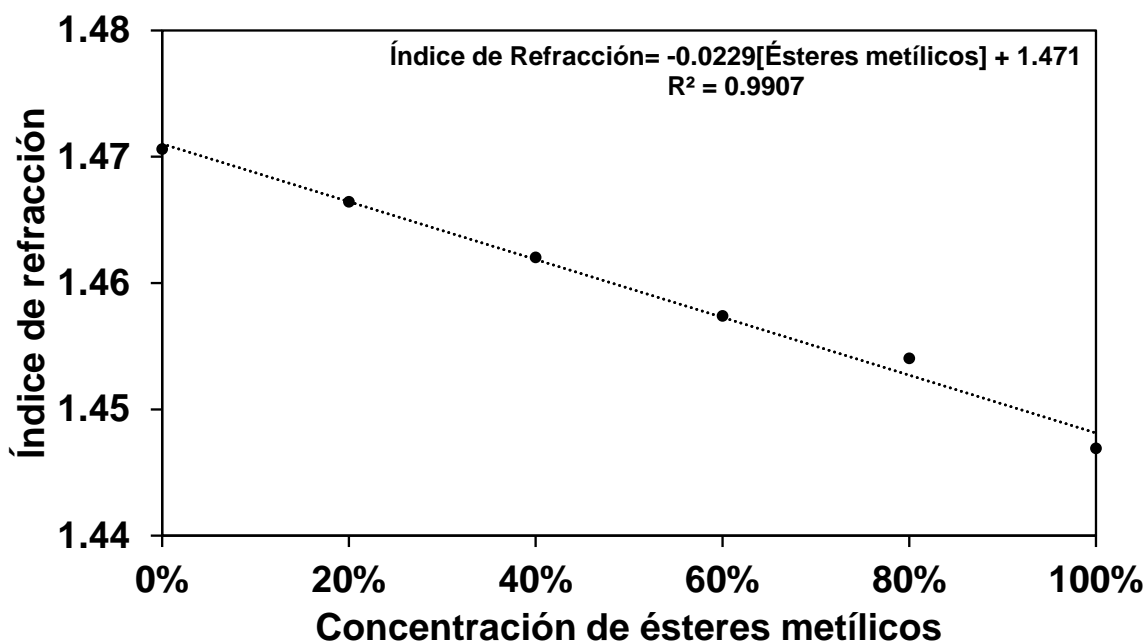


Figura 4. Curva de calibrado de concentración de ésteres metílicos (%v/v) contra índice de refracción.

En la Figura 5 se muestra el rendimiento de reacción alcanzado en las reacciones de transesterificación empleando los soportes de piedra caliza calcinada con cascarón de huevo. Se puede observar que en el soporte con una cantidad de 25% de cascarón de huevo (soporte 1), el rendimiento fue menor al 10%, debido a que posee una mayor cantidad de piedra caliza calcinada, que se ha descrito como un buen catalizador para la transesterificación de aceite, sin embargo, requiere de tiempos de reacción prolongados (3-7 h) y temperaturas de reacción superiores a 60 °C, por lo que no es posible considerar este catalizador como una alternativa eficiente y rápida [87]. Al aumentar la cantidad de cascarón de huevo a 50% (soporte

2) el rendimiento aumentó significativamente hasta 33% siendo este el soporte con mayor actividad. Los soportes con contenidos del 75% y 100 % de cascarón de huevo (soporte 3 y soporte 4, respectivamente) presentan una disminución del a 25% y 19%, respectivamente, esta disminución de la actividad se puede atribuir a la composición del cascarón de huevo que se encuentra en mayor proporción en estos catalizadores, ya que, si bien consta en su mayoría de CaCO_3 (71.8%) también posee en su composición 26.53% de MgCO_3 que forma MgO a $500\text{ }^\circ\text{C}$ [68]. Este compuesto si posee actividad catalítica, sin embargo, requiere de grandes cantidades de metanol para reaccionar y temperaturas de reacción muy elevadas ($200\text{ }^\circ\text{C}$), ya que a $60\text{ }^\circ\text{C}$ puede inhibirse [88]. El cascarón de huevo también contiene Na_2CO_3 en su composición (1.06%). sin embargo, es activo a temperaturas elevadas ($450\text{ }^\circ\text{C}$) y con grandes cantidades de catalizador (5-20 %p/p). Por otro lado, no es posible obtener Na_2O ya que este compuesto se obtiene a temperaturas de calcinación superiores a $800\text{ }^\circ\text{C}$ [89], por lo que los catalizadores 3 y 4, al tener mayor proporción de magnesio y sodio, se consideran menos activos que el catalizador 2. Por lo que la combinación de piedra caliza calcinada y cascarón de huevo en cantidades equivalentes (soporte 2) se eligió para la adición de iones K, Sr y Sr/K y su posterior evaluación catalítica en la reacción de derivatización del aceite de canola.

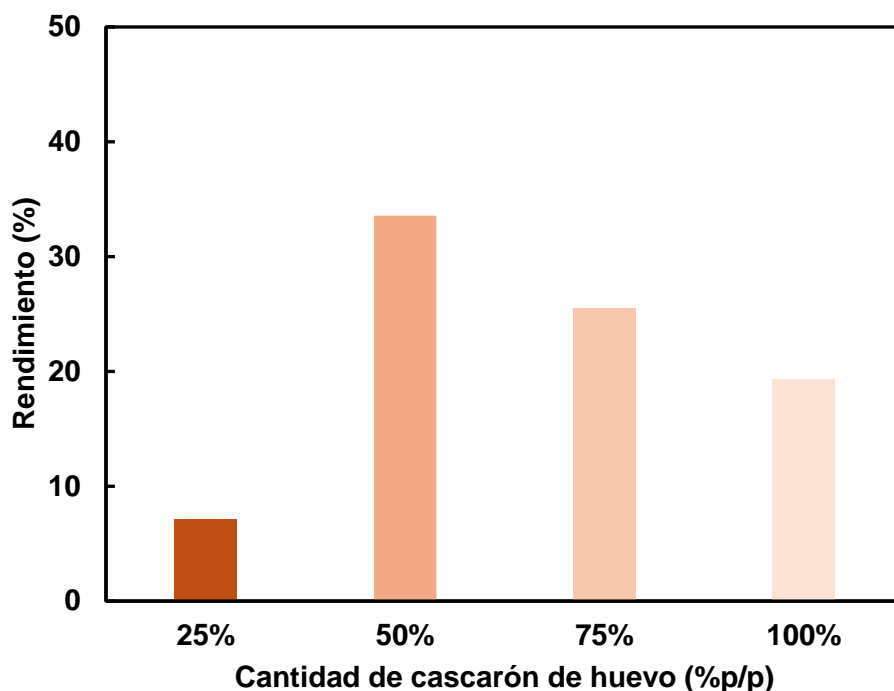


Figura 5. Rendimiento de los soportes sintetizados con distintas relaciones cascarón de huevo/piedra caliza calcinada (25%, 50%, 75% y 100%) con una relación molar metanol/aceite de 12.5, con 7 %p/p de catalizador a 60 °C por 1.5 h en aceite de canola.

En la Figura 6 se muestra el efecto de la adición de Sr, K y Sr/K al soporte de piedra caliza calcinada con cascarón de huevo (50%) en el rendimiento de la reacción. Los resultados muestran que el catalizador Sr/CaO presentó un rendimiento de solo el 10%, siendo inferior al soporte (33%), esta baja actividad puede deberse a la alta afinidad del SrO por el CO₂ que se encuentra en el medio ambiente, formando SrCO₃ que, resulta en un compuesto con baja actividad catalítica en esta reacción, ya que sus rendimientos son cercanos a 0% [78, 90]. Por otro lado, la adición de K al CaO presentó un rendimiento de 35%, el catalizador K/CaO presentó mayor actividad catalítica ya que la adición de potasio al CaO aumenta la superficie del catalizador y la fuerza básica, obteniendo rendimientos competentes en diversas matrices [91]. La combinación de ambos iones en el catalizador Sr/K/CaO alcanzaron un rendimiento de 52%, el rendimiento de reacción resultó superior a los dos catalizadores monometálicos, ya que a pesar de que el Sr se encuentre en forma de SrCO₃ aún aporta la estabilidad al catalizador y disminuye la lixiviación del potasio, que es el ion que posee mayor actividad catalítica [74, 78]. Por lo que el catalizador Sr/K/CaO fue seleccionado para optimizar las condiciones de reacción en la derivatización de triglicéridos provenientes de aceite de oliva y su posterior análisis del perfil de ácidos grasos.

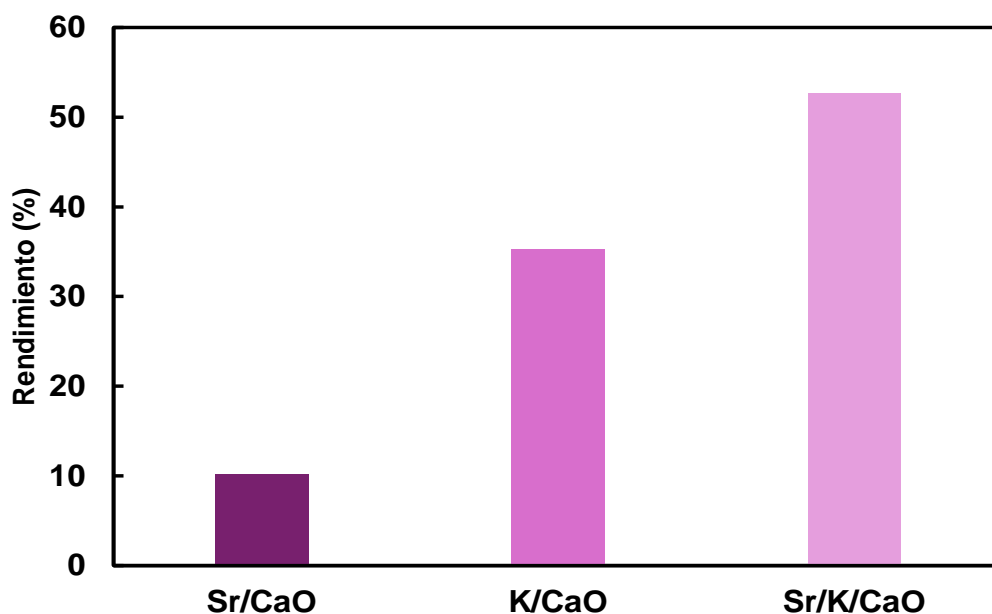
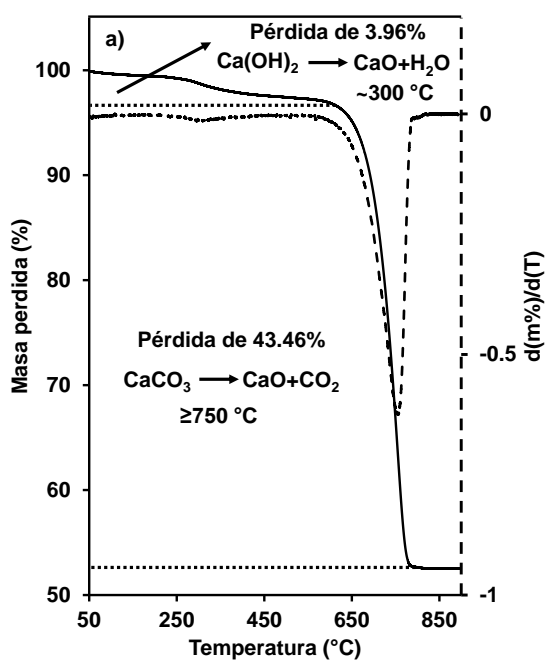


Figura 6. Rendimiento de reacción de los catalizadores adicionados con iones metálicos a 60 °C, relación molar metanol/aceite de 12.5, con 7 %p/p de catalizador por 1.5 h en la reacción de derivatización para el aceite de canola.

5.2. Caracterización de catalizadores

5.2.1. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico del soporte de cascarón de huevo-piedra caliza calcinada (CaO) y los catalizadores dopados con Sr y K se muestran en la Figura 7.



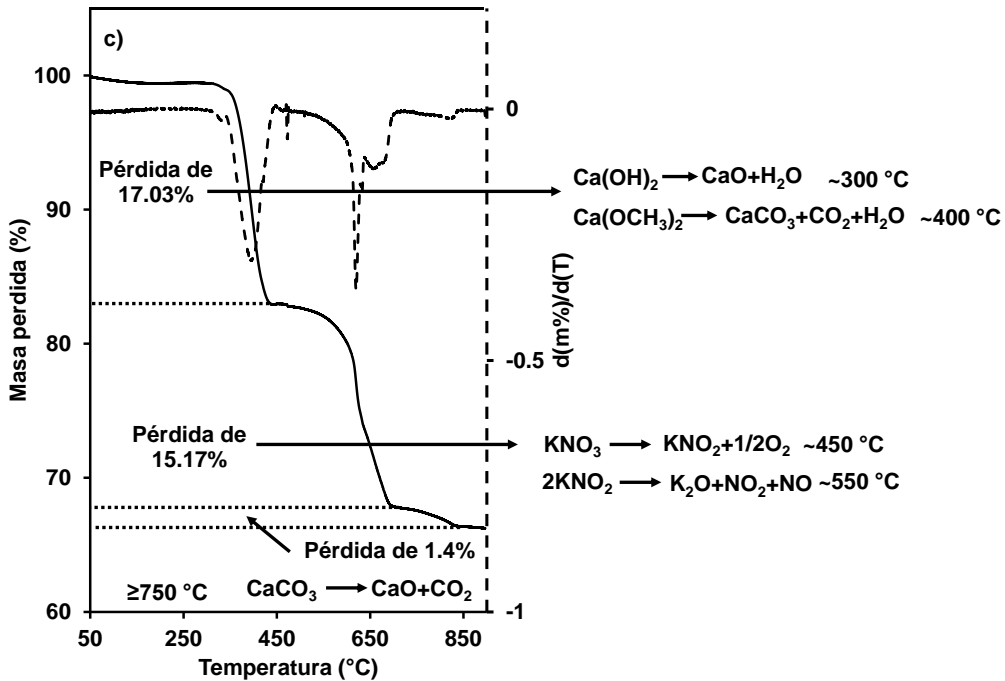
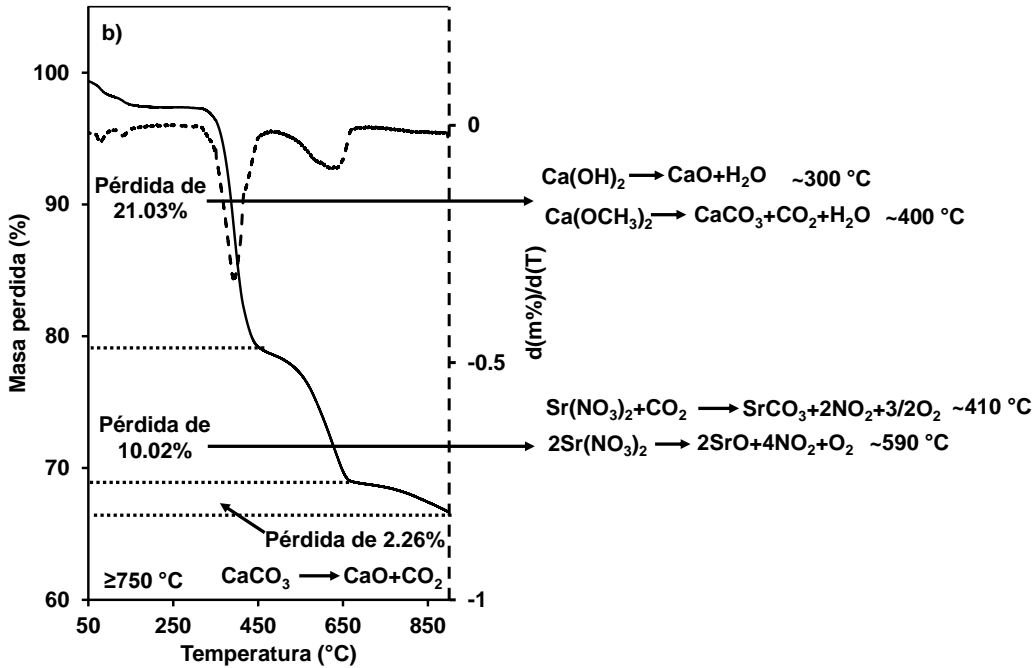


Figura 7. TGA-DTA del soporte a base de cascarón de huevo (a) y los catalizadores Sr/CaO(b), K/CaO(c).

Se emplearon distintos pesos para realizar el análisis de los catalizadores, por lo que las pérdidas de masa pueden ser distintas para cada uno. El soporte de CaO (Fig. 7a) mostró una ligera pérdida de peso (3.96%) desde temperatura ambiente

hasta 300 °C debido a la humedad adsorbida. Posteriormente, se observó una pérdida de peso del 43.46% alrededor de los 750 °C debido a la transformación de CaCO_3 en CaO y CO_2 [92]. El catalizador de Sr/CaO (Fig. 7b) mostró la descomposición del Ca(OH)_2 en 300 °C y la de $\text{Ca(OCH}_3)_2$ a 400 °C [93, 94] representando una pérdida del 17.03% y posteriormente, la reacción del $\text{Sr(NO}_3)_2$ con CO_2 que forma SrCO_3 en 410 °C y su posterior descomposición a SrO en una temperatura de 590 °C (10.02%) [80, 95, 96]. El proceso de descomposición del catalizador de K/CaO se llevó a cabo en cuatro etapas (Fig. 7 c). Primero un evento endotérmico a 300 °C que correspondió a la descomposición de Ca(OH)_2 y el segundo centrado en 400 °C (17.03%) que se atribuye a la transformación de $\text{Ca(OCH}_3)_2$ en CaCO_3 [94] ambas transformaciones representan una pérdida de peso de 17.03%. La tercera etapa ocurrió a 450 °C donde se llevó a cabo la descomposición de KNO_3 a KNO_2 y posteriormente, el KNO_2 se descompuso a K_2O a 550 °C, representando una pérdida de 15.17%. Aproximadamente a 750 °C se observa una pérdida de 1.4% correspondiente a la transformación de CaCO_3 a CaO [97, 98]. Por otro lado, el catalizador de Sr/K/CaO (Figura 8), de forma similar a los catalizadores K/CaO y Sr/CaO, mostró las señales en 300 °C y 400 °C (16.42%) correspondientes a la formación de CaO y CaCO_3 respectivamente. Posteriormente, se observan diversas señales entre 410 °C y 590 °C representando 15.09% del peso inicial. En este intervalo se observan las formaciones de SrCO_3 , KNO_2 , K_2O y SrO descritas anteriormente, ya que, los nitratos de potasio y estroncio se descomponen a temperatura muy cercanas, la señal de descomposición aparece en temperaturas similares que las figuras anteriores, pero en un tiempo más prolongado. Adicionalmente se puede observar a 500 °C la reacción entre el $\text{Sr(NO}_3)_2$ y KNO_3 dando lugar a la especie mixta $\text{K}_2\text{Sr(CO}_3)_2$ [99].

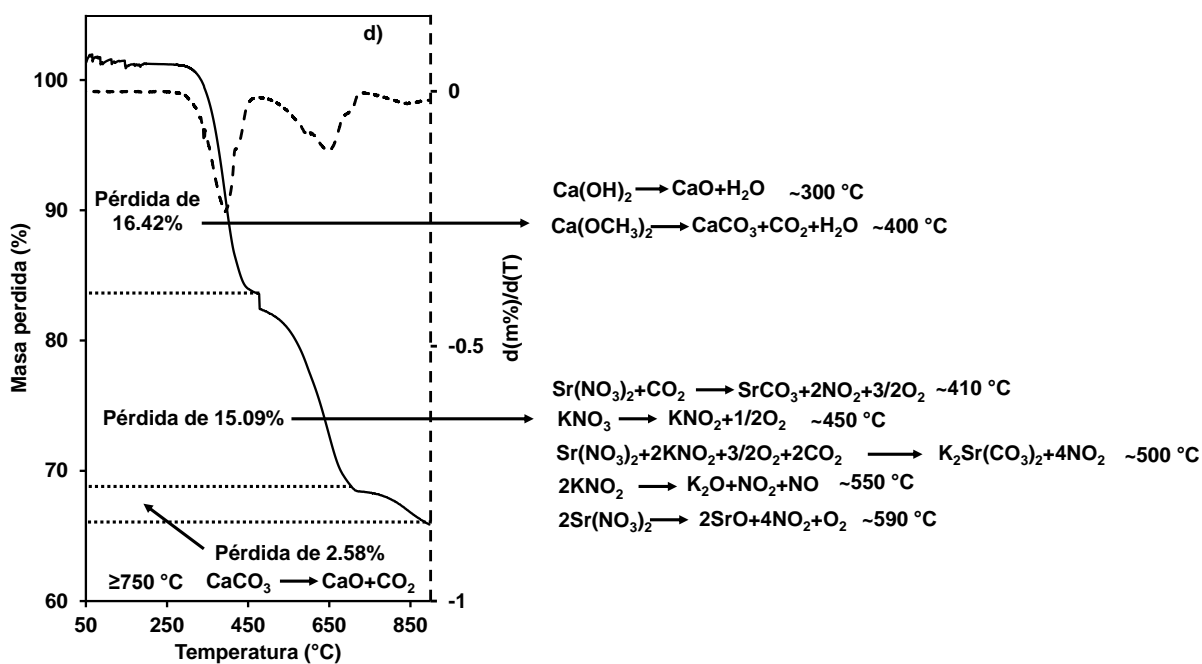


Figura 8. TGA-DTA del catalizador Sr/K/CaO.

5.2.2. Difracción de rayos X

Los perfiles de difracción de rayos X de los catalizadores calcinados se presentan en las Figura 9 y Figura 10.

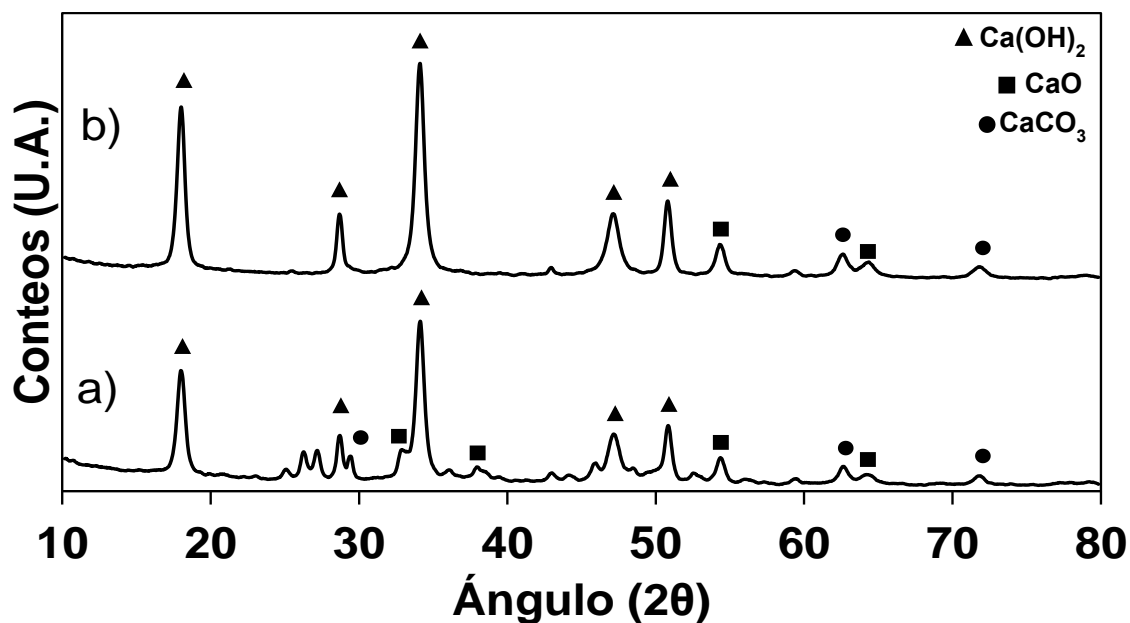


Figura 9. Patrones de DRX del cascarón de huevo calcinado a 800 °C (a) y del soporte a base de cascarón de huevo (b).

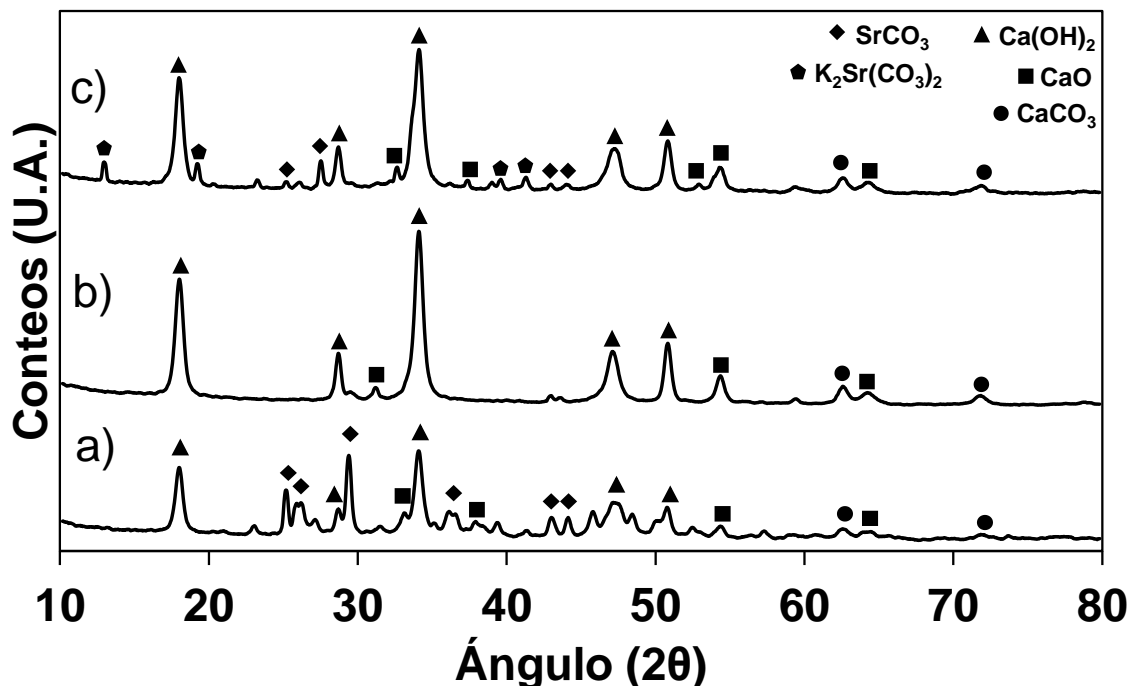


Figura 10. Patrones de DRX de los catalizadores Sr/CaO, K/CaO y Sr/K/CaO.

Las cinco muestras mostraron picos de difracción característicos de Ca(OH)_2 en estructura hexagonal debido a la higroscopicidad del CaO que se hidrata parcialmente [100]. La fase Ca(OH)_2 presentó señales de difracción en 2θ de 18.11°, 28.59°, 34.06°, 47.18°, 50.97° y 62.72° [101, 102]. El cascarón de huevo calcinado mostró señales a 29.54°, 54.36° y 64.4°, que corresponden al CaO [103, 104]. Por otro lado, el soporte de CaO constituido a partir de cascarón de huevo y piedra caliza calcinada, solo presentó las fases cristalinas en 54.36° y 64.4° del CaO ya que, en su mayoría se puede observar la presencia de señales características de Ca(OH)_2 . La adición de K al CaO , permitió observar la fase cristalina del CaO en 29.54°. Sin embargo, no fue posible observar K_2O por esta técnica ya que se adicionó una pequeña cantidad de K y sus partículas se encuentran dispersas en el catalizador. En el catalizador Sr/ CaO se observaron señales características de SrCO_3 localizadas en 25.02°, 26.02°, 29.48°, 36.17°, 43.09°, 44.21°, 45.77°, y 48.34° [105, 106]. El catalizador Sr/K/ CaO mostró la presencia de fases cristalinas de Ca(OH)_2 , CaO , CaCO_3 y SrCO_3 , estas últimas posiblemente formadas debido a la

impregnación de los iones con metanol, además de las señales características del compuesto $K_2Sr(CO_3)_2$ en 12.88° , 19.24° , 39.43° , 41.21° [83,99].

Posteriormente, se comparó el patrón de rayos X del catalizador de Sr/K/CaO nuevo y el mismo catalizador después un ciclo de uso (Figura 11). Se puede observar que las señales pertenecientes al CaO disminuyeron significativamente tras usarse, lo que puede indicar que este compuesto posee actividad catalítica y es capaz de llevar a cabo la reacción de transesterificación. Por otro lado, el $Ca(OH)_2$ y $SrCO_3$ no presentan modificaciones en sus señales ya que no son fases activas.

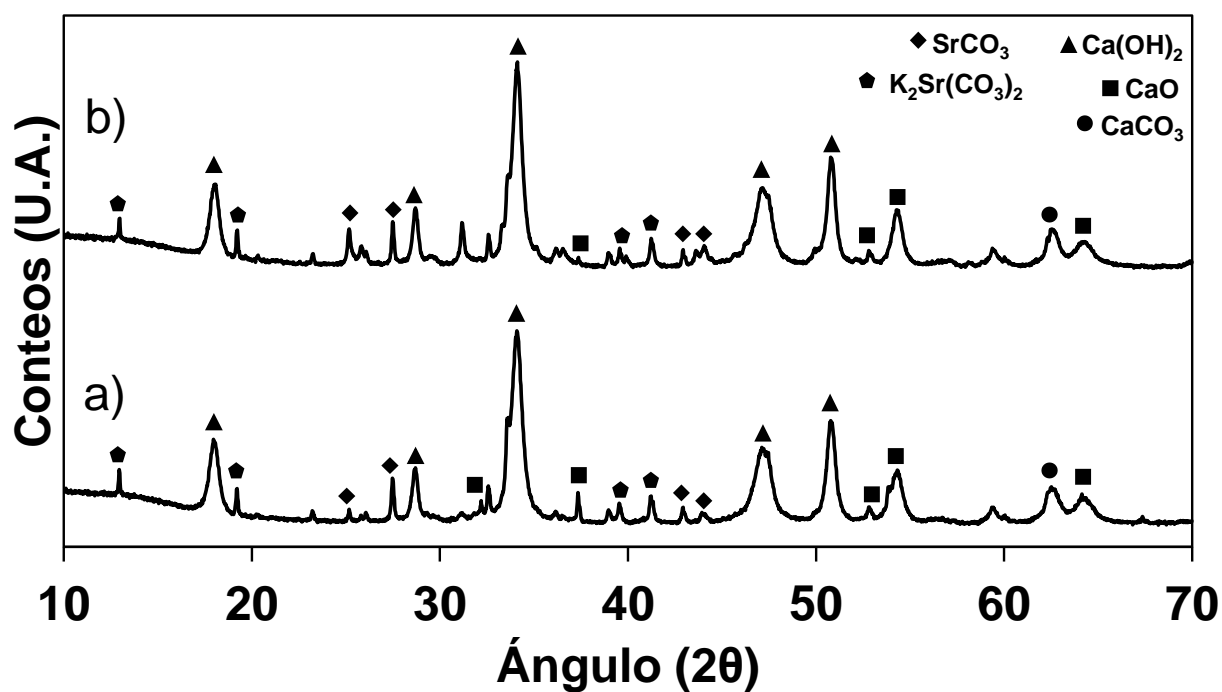


Figura 11. Patrones de DRX del catalizador Sr/K/CaO nuevo (a) y el catalizador tras un ciclo de uso (b).

5.2.3. Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) del soporte y los catalizadores se muestran en la Figura 12.

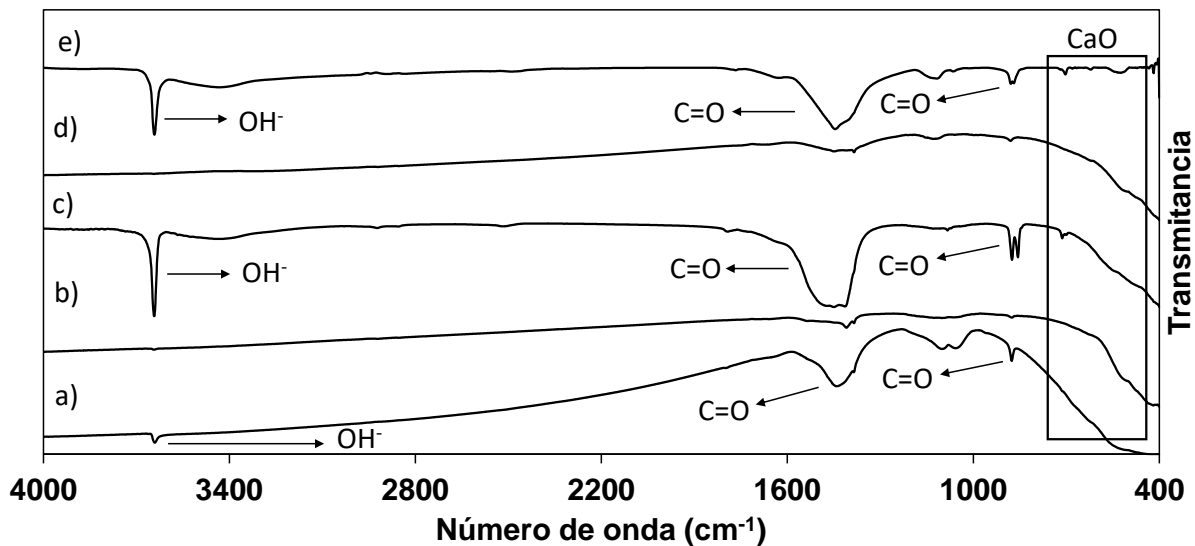


Figura 12. Espectros de infrarrojo del cascarón de huevo calcinado a 800 °C (a), soporte b), catalizadores Sr/CaO (c), K/CaO (d) y Sr/K/CaO (e) en un número de onda de 4000-400 cm^{-1} .

Las bandas predominantes en 3637 cm^{-1} son características del grupo funcional OH^- que se encuentra enlazado a un metal, en este caso el Ca^{2+} , el compuesto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se forma a partir de la humedad del aire y se debe al carácter higroscópico del CaO [107]. Adicionalmente, las bandas mostradas a partir de 523 cm^{-1} se atribuyen a óxidos metálicos, confirmando la presencia de CaO [87].

Por otro lado, las bandas ubicadas en 1427 cm^{-1} y 874 cm^{-1} son características de los enlaces C=O pertenecientes a grupos carbonatos (CO_3^{2-}) formados durante la calcinación al realizarse esta en una atmósfera de aire que contenía CO_2 y que reaccionó con los óxidos metálicos [108].

5.2.4. Índices de Hammett

El análisis de fuerza y la cantidad de sitios básicos se llevaron a cabo mediante la evaluación colorimétrica de los índices de Hammett y valoraciones por retroceso respectivamente. La fuerza básica de los catalizadores y la cantidad de sitios básicos se muestran en la Tabla 5.

Se puede observar que el soporte presentó una fuerza de 8.2-9.8, la incorporación de iones K al soporte de CaO aumenta su fuerza básica en un intervalo de 9.8-10.1. Sin embargo, la adición de Sr al soporte disminuyó la fuerza básica a 7.6-8.2. Por otro lado, la incorporación de ambos iones al soporte provee de una fuerza similar a la del catalizador K/CaO. De esta forma se puede relacionar la fuerza básica con la actividad catalítica, siendo el catalizador Sr/K/CaO el de mayor actividad, seguido del K/CaO, el soporte de CaO y finalmente el Sr/CaO.

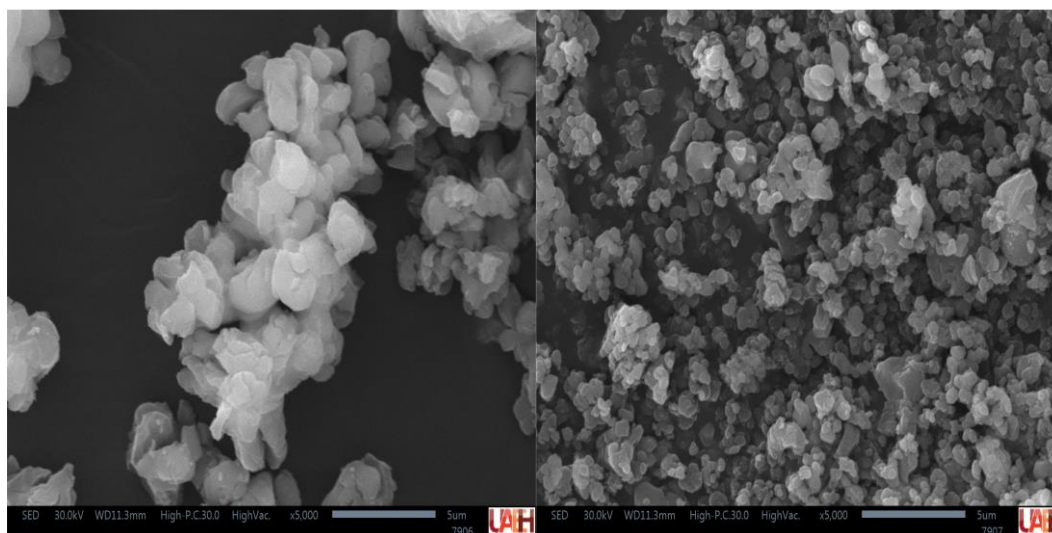
Tabla 5. Sitios básicos totales y fuerza básica de los catalizadores y soporte sintetizados.

Catalizador	Sitios básicos totales ($m_{eq} \text{ NaOH/g}_{cat}$)	Fuerza básica
CaO	23.39±0.25	8.2<H ₀ <9.8
Sr/CaO	16.93±0.66	7.6<H ₀ <8.2
K/CaO	28.34±0.51	9.8<H ₀ <10.1
Sr/K/CaO	32.53±0.92	9.8<H ₀ <10.1

A partir del cálculo de sitios básicos totales se puede observar la misma tendencia que relaciona la basicidad con la actividad, ya que la adición de estroncio al soporte de CaO disminuye los sitios básicos en comparación con el soporte de CaO sin adición de iones. Por otro lado, el potasio si aumenta los sitios básicos totales, pero sigue manteniéndose inferior al catalizador Sr/K/CaO, que igualmente presenta mayor actividad que el catalizador monometálico de potasio.

5.2.5. Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 13 se presentan las micrografías electrónicas de barrido de cascarón de huevo calcinado a 800 °C, soporte de CaO y los catalizadores monometálicos K/CaO y Sr/CaO.



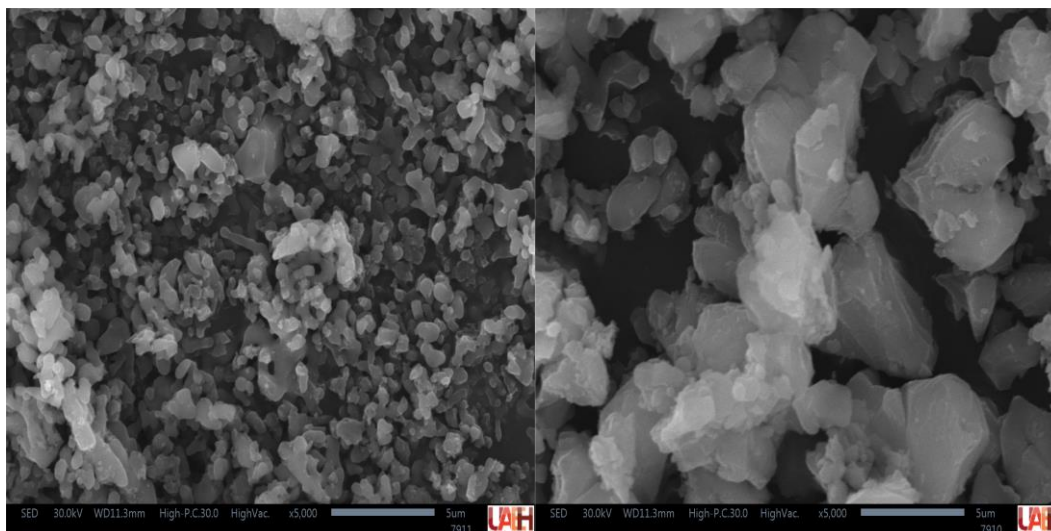


Figura 13. Imágenes SEM (aumento x5000) de cascarón de huevo y soporte de CaO (arriba), catalizadores Sr/CaO y K/CaO calcinados a 800 °C (abajo).

Se puede observar que los cascarones de huevo calcinados están conformados por aglomerados de partículas de 10 - 15 μm de largo conformadas por monolitos de 2.5 μm , los resultados son congruentes con lo descrito en la calcinación parcial del cascarón de huevo a 800°C [109, 110]. Por otro lado, el soporte de CaO, que está compuesto por cascarón de huevo calcinado y piedra caliza calcinada, dio lugar a monolitos de menor tamaño de 0.65 – 1.25 μm . La incorporación del K provocó que los monolitos incrementaran su tamaño entre 5-8 μm . Sin embargo, en Sr/CaO, el tamaño de partícula se mantuvo similar a la del soporte de CaO con monolitos entre 0.8-1.5 μm [74, 111]. Posiblemente se deba a la formación de SrCO_3 . Al combinarse el Sr y el K (Figura 14), el tamaño de partícula incrementó respecto al soporte con monolitos de 4.94 μm , se puede atribuir el aumento de tamaño a la formación de la fase mixta $\text{K}_2\text{Sr}(\text{CO}_3)_2$ [99].

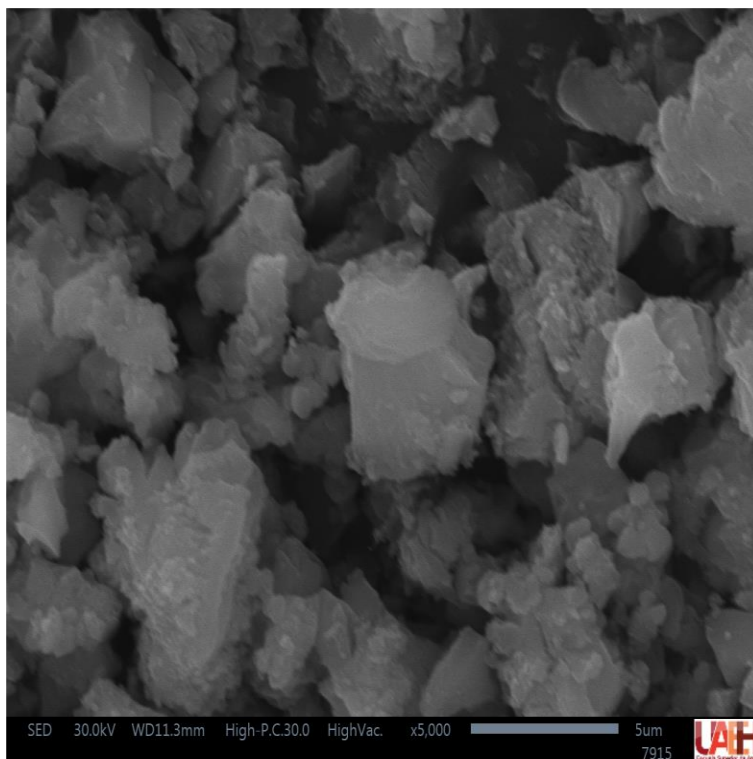


Figura 14. Imagen SEM (aumento x5000) del catalizador Sr/K/CaO.

5.3. Optimización de las condiciones de reacción

La Tabla 6 muestra la matriz de diseño de experimentos de superficie Box-Behnken de 3 factores y 2 niveles, se evaluaron las siguientes variables: relación molar MeOH/aceite (A), temperatura (B) y tiempo (C), como variable de salida se eligió la relación señal C18:1/estándar interno. Posteriormente, se analizaron los resultados de los 15 experimentos obtenidos.

Tabla 6. Valores de relación señal C18:1/estándar interno obtenidos en los distintos experimentos realizados.

Exp	A	B	C	C18:1
1	10.0 (-1)	70.0 (1)	1.0 (0)	0.39
2	12.5 (0)	70.0 (1)	0.5 (-1)	0.10
3	12.5 (0)	70.0 (1)	1.5 (1)	0.25
4	15.0 (1)	70.0 (1)	1.0 (0)	0.65
5	10.0 (-1)	60.0 (0)	0.5 (-1)	0.10
6	10.0 (-1)	60.0 (0)	1.5 (1)	0.03

7	15.0 (1)	60.0 (0)	0.5 (-1)	0.12
8	15.0 (1)	60.0 (0)	1.5 (1)	0.36
9	10.0 (-1)	50.0 (-1)	1.0 (0)	0.44
10	12.5 (0)	50.0 (-1)	0.5 (-1)	0.35
11	12.5 (0)	50.0 (-1)	1.5 (1)	0.70
12	15.0 (1)	50.0 (-1)	1.0 (0)	0.22
13	12.5 (0)	60.0 (0)	1.0 (0)	0.46
14	12.5 (0)	60.0 (0)	1.0 (0)	0.59
15	12.5 (0)	60.0 (0)	1.0 (0)	0.44

A partir de los resultados obtenidos se realizó el análisis de varianza de los modelos lineal, cuadrático y de interacciones para describir el comportamiento que sigue el sistema planteado. En la Tabla 7 se puede observar que los valores generales de probabilidad (p) pertenecientes a los modelos lineal, cuadrático y de interacciones superan 0.05, por lo que los tres modelos y sus factores son críticos. El valor de R^2 fue de 0.7923. A partir del valor de R^2 y de los valores de p se puede describir el modelo como un sistema cuadrático completo, siendo el modelo cuadrático de la relación molar MeOH/aceite la de mayor contribución (21.85%). Posteriormente, empleando el software Minitab 17, se obtuvo la ecuación del modelo, a partir de ésta se realizó el cálculo de contribuciones, donde se observa que el modelo de interacciones es el de mayor contribución al sistema, este resultado se complementa con la obtención de R^2 y los valores de p .

Tabla 7. Análisis de varianza de los modelos, obtenido a partir del diseño de experimentos.

Modelo	g.l.	SS	MS	p	Contribución (%)
Lineal	3	0.09443	0.03148	0.385	15.55
Cuadrático	3	0.16299	0.05433	0.212	27.09
Interacciones	3	0.22363	0.07454	0.137	36.83
Total	14	0.60713			

Mediante la ecuación del modelo se obtuvieron los gráficos de superficie para la optimización de factores, los valores óptimos se mantuvieron constantes para identificar los puntos máximos de las tres variables. En la Figura 15 se puede observar el gráfico de superficie de temperatura y tiempo contra la variable de salida, el comportamiento del gráfico se puede describir mediante un modelo

cuadrático, ya que presenta las curvaturas características del mismo. El gráfico muestra que a valores máximos de tiempo (1.5 h) y temperatura (70 °C) se pueden obtener los resultados óptimos para la variable de salida. Ya que, anteriormente se ha descrito que las temperaturas donde se pueden obtener mayor cantidad de ésteres metílicos se encuentran entre 60 °C y 70 °C dependiendo del material de partida, por otro lado, las reacciones de transesterificación se llevan a cabo entre 2 y 3 horas [54], sin embargo, se busca reducir el tiempo de reacción para obtener una metodología más rápida que las descritas con anterioridad [69].

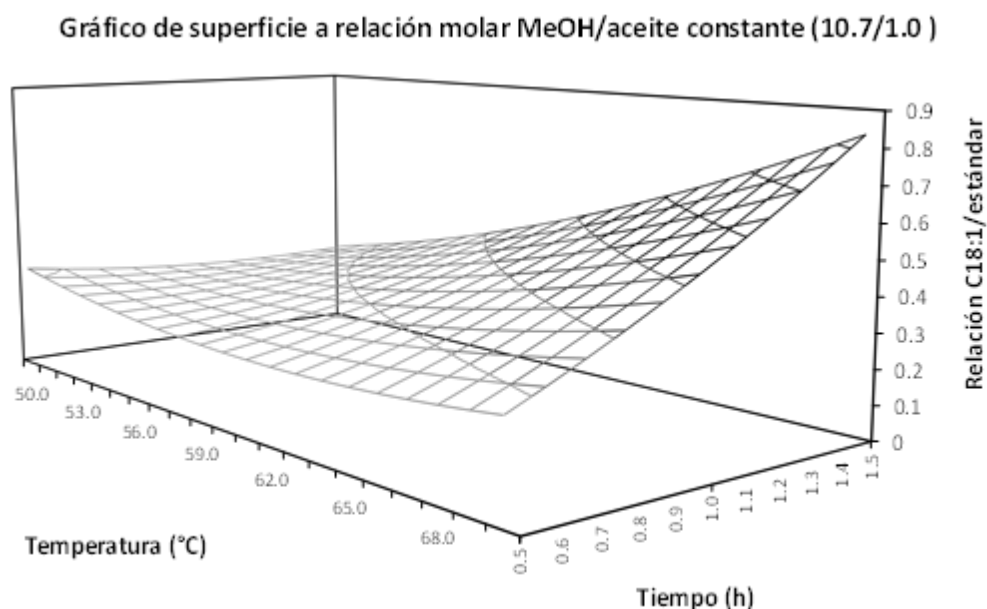


Figura 15. Gráfico de superficie de temperatura y tiempo contra relación señal C18:1/estándar interno.

La Figura 16 muestra el gráfico de superficie de relación molar MeOH/aceite y temperatura contra la variable de salida. Al igual que la Figura 8, el gráfico se ajusta a un modelo cuadrático completo y se observan los puntos de optimización a una temperatura de 70 °C y una relación molar MeOH/aceite de 10.7. Contrario al tiempo y temperatura, el factor A presenta su punto óptimo a una baja relación molar MeOH/aceite, ya que la adición de un exceso de metanol puede inhibir al catalizador, reduciendo su actividad y los rendimientos de reacción [59].

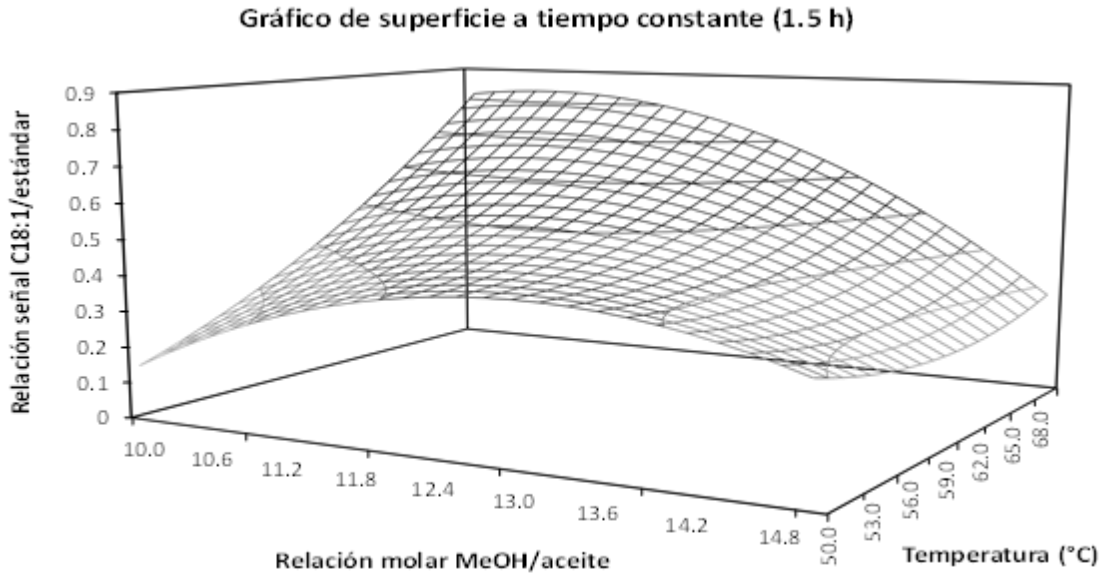


Figura 16. Gráfico de superficie de relación molar MeOH/aceite y temperatura contra relación señal C18:1/estándar interno.

La Figura 17 muestra el gráfico de superficie de la relación molar MeOH/aceite y tiempo contra la variable de salida. Los valores óptimos obtenidos fueron: relación molar MeOH/aceite de 10.7, tiempo 1.5h y temperatura de 70 °C.

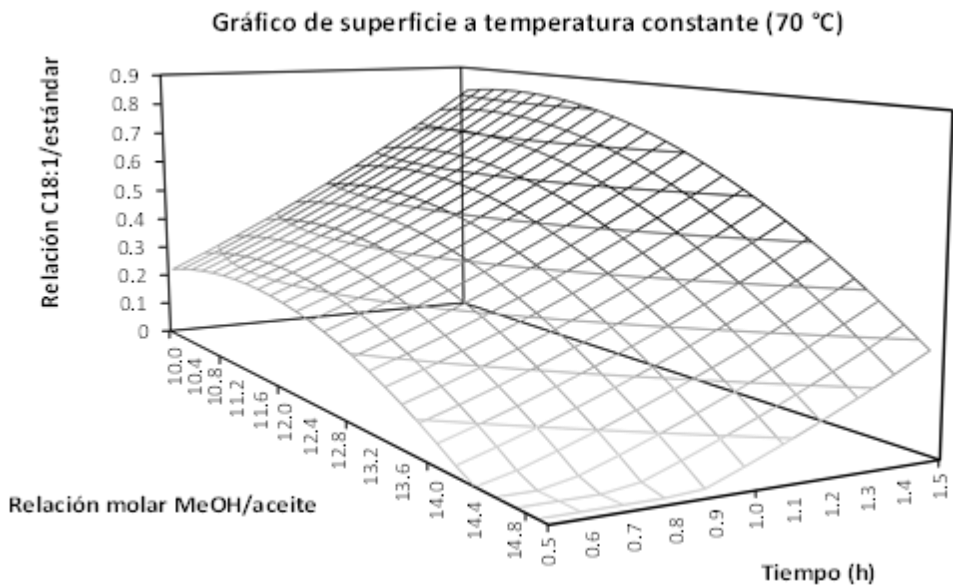


Figura 17. Gráfico de superficie de relación molar MeOH y tiempo contra relación señal C18:1/estándar interno.

Se realizaron dos experimentos a las condiciones óptimas de reacción, la Figura 18 muestra los cromatogramas obtenidos a dichas condiciones, se puede observar la presencia de los cinco ácidos grasos principales del aceite de oliva a los tiempos de retención registrados por el estándar. Se calcularon las relaciones de señal C18:1/estándar interno y se obtuvo una media de 0.97 ± 0.01 , siendo un valor superior al predicho por el modelo estadístico (0.85).

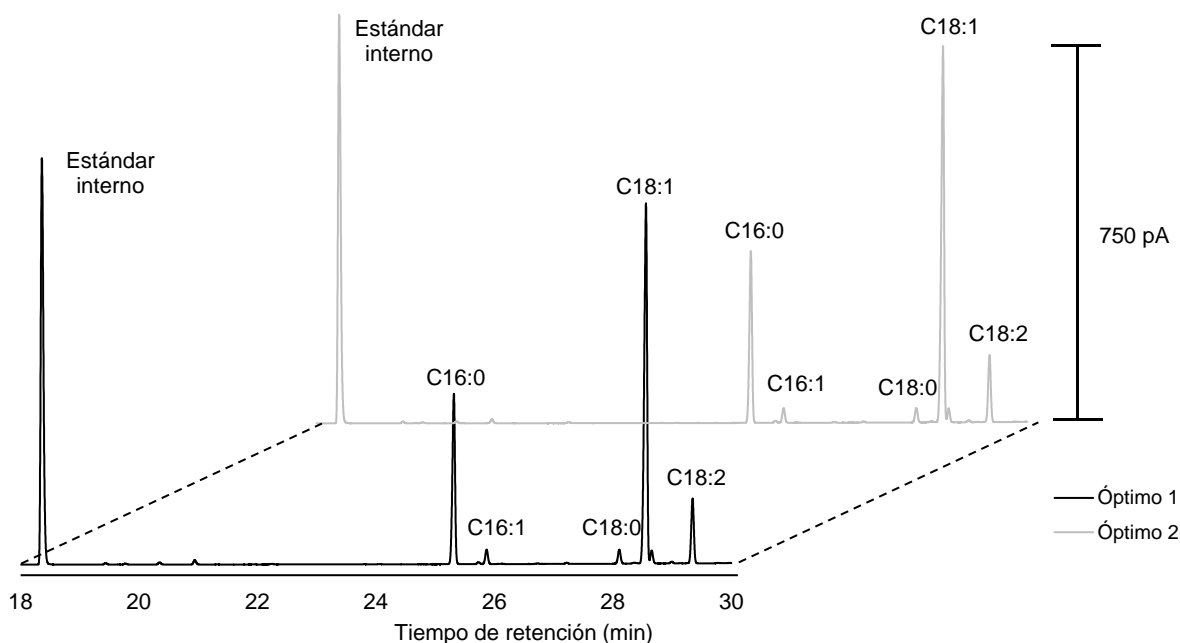


Figura 18. Cromatogramas obtenidos a partir de los valores óptimos encontrados con los gráficos de superficie.

5.4. Validación de la metodología

Debido a que el perfil de ácidos grasos se determina mediante sumatoria de área, se determinaron únicamente la precisión y exactitud del método. Respecto a la precisión, se analizó una muestra de aceite por triplicado en días diferentes encontrando los siguientes resultados. Se puede observar que las proporciones de ácidos grasos (Tabla 8) presentan una desviación estándar relativa menor al 3%, lo que representan una metodología reproducible.

Tabla 8. Proporción de los ácidos grasos principales presentes en el aceite de oliva analizado por triplicado en días diferentes.

Ácido graso	Experimento			%DER (n=3)
	1	2	3	
<i>C16:0</i>	25.86	25.68	25.27	1.18
<i>C16:1</i>	2.20	2.20	2.26	1.56
<i>C18:0</i>	2.19	2.22	2.19	0.79
<i>.C18:1</i>	60.00	60.06	60.13	0.11
<i>C18:2</i>	9.75	9.84	10.15	2.12

La exactitud del método se evaluó por comparación con los resultados obtenidos empleando la metodología oficial. La Figura 19 muestra los cromatogramas obtenidos del análisis empleando ambas metodologías. En ambos casos se presentan las señales de los cinco ácidos grasos, sin embargo, se puede observar que las alturas de pico de la metodología por BF_3 son significativamente menores.

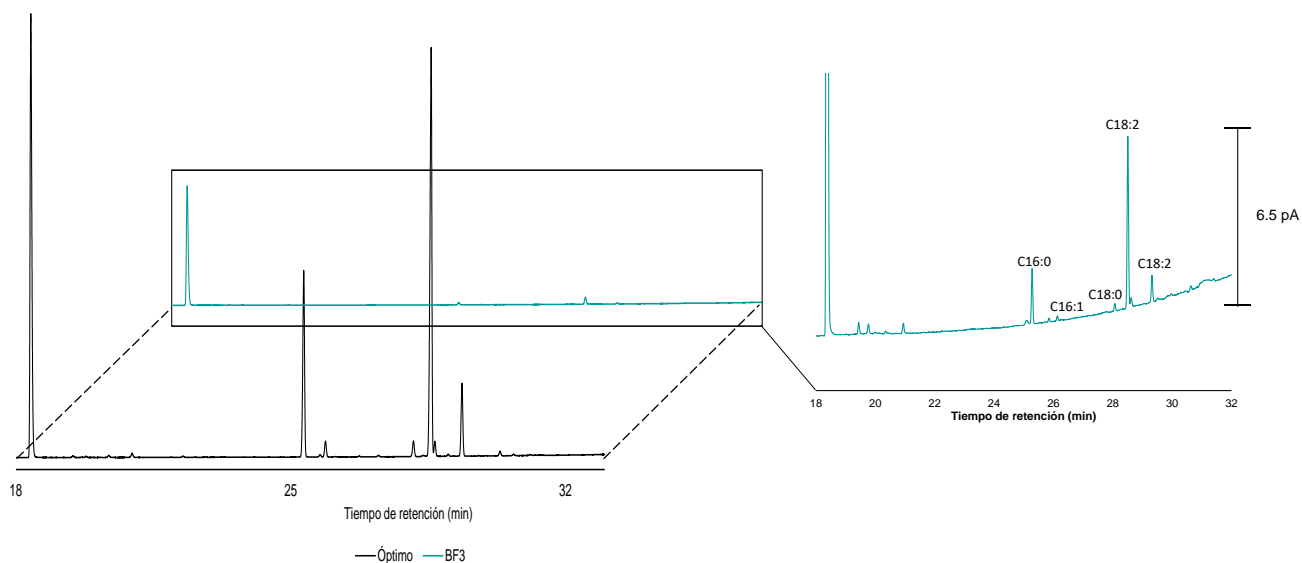


Figura 19. Comparación del cromatograma obtenido mediante la metodología oficial utilizando BF_3 como catalizador contra cromatograma obtenido con el catalizador de CaO a condiciones óptimas.

Los resultados de las proporciones de ácidos grasos se presentan en la Tabla 9, Se puede observar que las proporciones de los ácidos grasos presentan algunas

variaciones en su composición, se realizó una prueba t de comparación de pares de valores ($p>0.05$), el cual mostró que no existe diferencia significativa entre las proporciones de los ácidos grasos de ambas metodologías. Respecto a los valores obtenidos, el ácido palmítico presenta una concentración superior a los descritos por la norma, que puede atribuir a la fabricación del aceite. La metodología propuesta es más económica y rápida, evita el uso de solventes, además los cromatogramas obtenidos muestran picos de mayor intensidad y una proporción de ácidos grasos similar a la metodología oficial.

Tabla 9. Proporción de ácidos grasos obtenidos por la metodología oficial y la metodología propuesta.

Ácido graso	Valores obtenidos (%)		
	Método propuesto	BF ₃ /MeOH	Proporciones aceite de oliva
16:0	25.85	25.42	7.5-20.0%
16:1	2.20	1.35	0.3-3.5%
18:0	2.19	2.71	0.5-5.0%
18:1	60.00	61.03	55.0-83.0%
18:2	9.75	9.48	3.5-21.0%

Adicionalmente la metodología propuesta se aplicó en el análisis de aceites de oliva y girasol usados. Las Figuras 20 y 21 muestran los cromatogramas comparando los aceites usados con los aceites nuevos. El aceite de oliva usado muestra las cinco señales descritas en la normativa, sin embargo, el aceite de girasol muestra diversas señales.

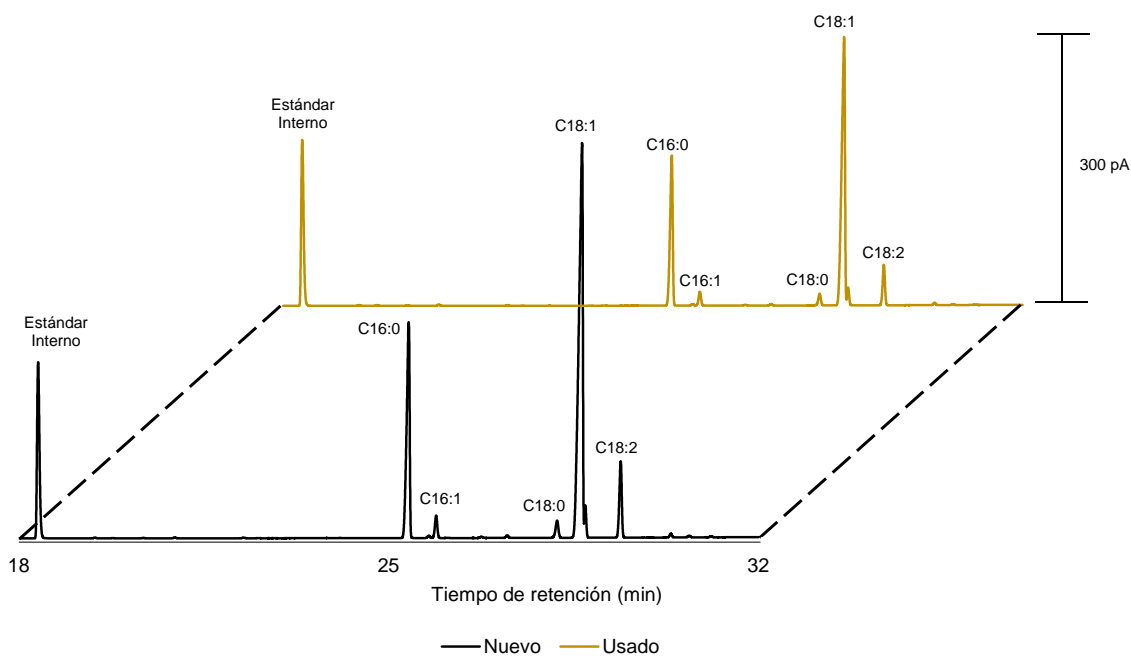


Figura 20. Cromatogramas de aceite de oliva nuevo y usado a condiciones de análisis óptimas.

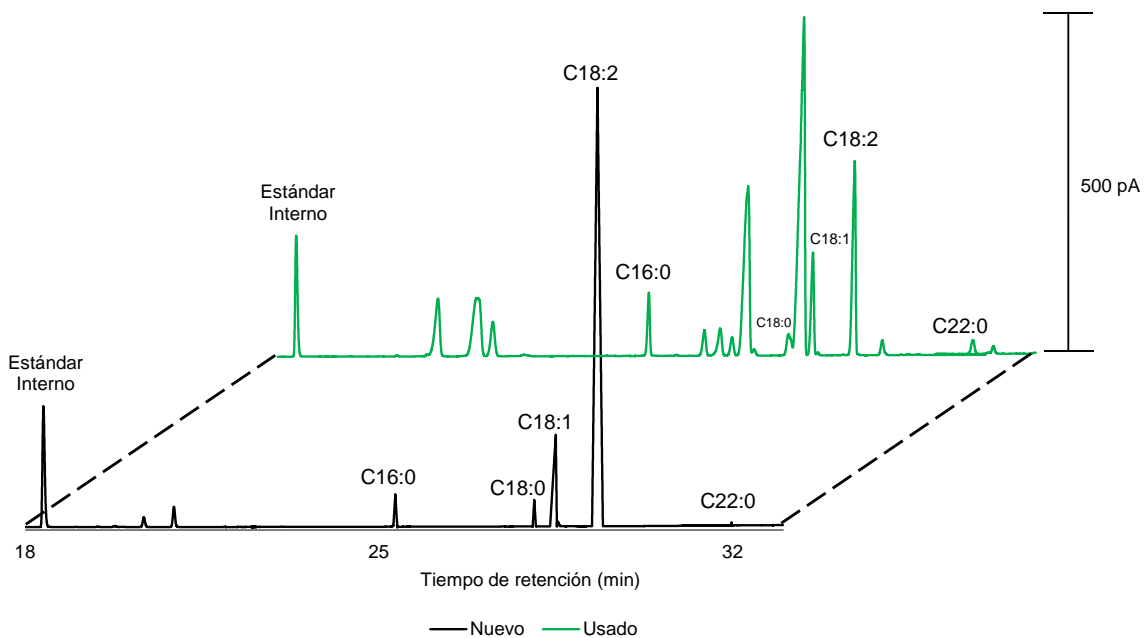


Figura 21. Cromatogramas de aceite de girasol nuevo y usado a condiciones de análisis óptimas.

Las proporciones de los ácidos grasos para el aceite de oliva y de girasol se muestran en las Tablas 10 y 11, para el aceite de oliva se puede observar que cuatro de los cinco ácidos grasos se mantienen dentro de lo descrito por la norma, sin embargo, el ácido graso que se encuentra fuera del intervalo es el ácido palmítico, por lo que este aumento se puede deber a la fabricación del aceite.

Por otro lado, se identificaron los ácidos grasos principales del aceite de girasol usado, sin embargo, tres de los cinco ácidos grasos se encuentran en proporciones mayores a la normativa, de igual forma, el cromatograma del aceite usado muestra ácidos grasos que no pertenecen a su composición, por lo que los ácidos grasos pertenecientes a los alimentos pudieron mezclarse con el aceite de girasol.

Tabla 10. Proporción de ácidos grasos del aceite de oliva nuevo y usado.

Valores obtenidos (%)			
C	Nuevo	Usado	Proporciones aceite de oliva
16:0	26.10	27.66	7.5-20.0%
16:1	2.17	2.33	0.3-3.5%
18:0	1.96	2.07	0.5-5.0%
18:1	62.28	61.39	55.0-83.0%
18:2	7.48	6.55	3.5-21.0%

Tabla 11. Proporción de ácidos grasos del aceite de girasol nuevo y usado.

Valores obtenidos (%)			
C	Nuevo	Usado	Proporciones aceite de girasol
16:0	5.81	13.15	5.0-7.6%
18:0	4.48	8.06	2.7-6.5%
18:1	15.36	24.25	14.0-39.4%
18:2	71.55	50.56	48.3-74.0%
22:0	1.10	3.98	0.3-1.5%

6. Conclusiones

Se sintetizó un catalizador heterogéneo para la derivatización de triglicéridos y ácidos grasos, se optó por el uso de CaO ya que es un material de fácil acceso, económico y no tóxico. Se eligió como fuente de calcio a la piedra caliza calcinada debido a que es un material abundante en la industria de la construcción y los cascarones de huevo ya que son un desecho común en la industria alimenticia. Se evaluaron cuatro composiciones de soporte, donde la composición equivalente entre ambos materiales resultó la más activa. Sin embargo, su actividad se ve limitada por problemas de transferencia de materia y lixiviación, por lo que el catalizador fue adicionado con iones estroncio (9 %p/p) y potasio (9 %p/p) para aumentar su actividad y mejorar su estructura, ya que el estroncio provee al CaO de estabilidad estructural y disminuye la lixiviación de calcio y otros iones adicionados, mientras que el potasio brinda de mayor actividad catalítica con el objetivo de mejorar los rendimientos de reacción. La evaluación catalítica mostró que una cantidad equivalente de CaO proveniente de piedra caliza calcinada y CaO proveniente de cascarón de huevo, adicionada con ambos iones, estroncio y potasio, es más activa que otras combinaciones de compuestos realizadas.

La caracterización del catalizador por distintas técnicas como lo son SEM, índices de acidez, TGA, FT-IR y DRX, arrojó que la estructura del catalizador está compuesta en su totalidad por microcristales de aproximadamente 5 μm de ancho y 10 μm de altura. Por otro lado, el catalizador mostró una fuerza básica de entre 9.8 y 10.1, lo que le proporciona mayor actividad que los catalizadores monometálicos y que el soporte. Las temperaturas de descomposición indicaron que a 800 °C la constitución mayoritaria del catalizador son óxidos, ya que los hidróxidos y nitratos se descomponen a temperaturas inferiores. Por otro lado, la espectroscopía IR exhibió la presencia de enlaces OH^- y CO_3^{2-} pertenecientes a sales inorgánicas. La caracterización por DRX mostró que el catalizador está formado principalmente de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguido del CaO, al que se le atribuye la fase activa del catalizador, ya que, tras un ciclo de uso, la presencia de éste se ve reducida, igualmente es posible visualizar la presencia de SrCO_3 , formado a partir de la calcinación del catalizador en una atmósfera de aire y en el caso del catalizador bimetálico se observó una fase mixta de estroncio y potasio, que posiblemente tenga participación en las reacciones de derivatización.

Se diseñó una metodología para la determinación del perfil de ácidos grasos a partir del catalizador a base de CaO y adicionado con estroncio y potasio evaluado anteriormente. El catalizador no mostró dificultad en la transformación de triglicéridos a ésteres metílicos a las condiciones de reacción establecidas, obteniendo una metodología rápida y económica. A partir del diseño de experimentos se obtuvieron las condiciones óptimas de reacción, los resultados de estos experimentos se compararon con la metodología descrita por la ISO 12966, mostrando que la metodología propuesta es competitiva en comparación con metodologías oficiales emitidas por entidades reguladoras internacionales, ya que

la metodología propuesta obtuvo alturas de pico superiores a la metodología oficial sin alterar la composición de los ácidos grasos. Adicionalmente, se realizó la evaluación de otras matrices, como lo son aceites usados, a condiciones óptimas, obteniendo resultados favorables en la reacción de derivatización, sin embargo, los ácidos grasos no se encuentran dentro de las proporciones descritas por la normativa, esto se puede atribuir a la permanencia de ácidos grasos provenientes de diversos alimentos y que son ajenos a la composición del aceite.

7. Referencias

1. Domínguez, R., Pateiro, M., Purriños, L., Munekata, P. E. S., Echegaray, N., & Lorenzo, J. M. (2022). Introduction and classification of lipids. *In Food Lipids* (pp. 1-16).
2. Chiu, H. H., & Kuo, C. H. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of food and drug analysis*, 28(1), 60-73.
3. Kerr, B. J., Kellner, T. A., & Shurson, G. C. (2015). Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 1-23.
4. Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1-7).
5. Wu, Z., Zhang, Q., Li, N., Pu, Y., Wang, B., & Zhang, T. (2017). Comparison of critical methods developed for fatty acid analysis: A review. *Journal of separation science*, 40(1), 288-298.
6. Petrović, M., Kezić, N., & Bolanča, V. (2010). Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry*, 122(1), 285-291.
7. Hewavitharana, G. G., Perera, D. N., Navaratne, S. B., & Wickramasinghe, I. (2020). Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8), 6865-6875.
8. Aghbashlo, M., Peng, W., Tabatabaei, M., Kalogirou, S. A., Soltanian, S., Hosseinzadeh-Bandbafha, H., Mahiam, O., & Lam, S. S. (2021). Machine learning technology in biodiesel research: A review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 85, 100904.
9. Ali, S. D., Javed, I. N., Rana, U. A., Nazar, M. F., Ahmed, W., Junaid, A., Pasha, M., Nazir, R., & Nazir, R. (2017). Novel SrO-CaO Mixed Metal Oxides Catalyst for Ultrasonic-Assisted Transesterification of Jatropha Oil into Biodiesel. *Australian Journal of Chemistry*, 70(3), 258-264.
10. Zambiasi, R. C., Przybylski, R., Zambiasi, M. W., & Mendonça, C. B. (2007). Composição em ácidos graxos de óleos e gorduras vegetais. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 25.
11. Fasina, O. O., & Colley, Z. (2008). Viscosity and Specific Heat of Vegetable Oils as a Function of Temperature: 35°C to 180°C. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 738-746.
12. Shahidi, F. (Ed.). (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Industrial and Nonedible Products from Oils and Fats* (Vol. 6). John Wiley & Sons.
13. Gunstone, F. (Ed.). (2011). *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. John Wiley & Sons.
14. Alajtal, A. I., Sherami, F. E., & Elbagermi, M. A. (2018). Acid, peroxide, ester and saponification values for some vegetable oils before and after frying. *AASCIT Journal of Materials*, 4(2), 43-47.
15. Tabasum, S., Ahmad, H. B., Asghar, S., Akhtar, N., & Ashraf, S. N. (2012). Physicochemical characterization and frying quality of canola and sunflower oil samples. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 34(6), 513-517.

16. Grompone, M. A. (2020). Sunflower and High Oleic Sunflower Oils. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (pp. 1–54).
17. Przybylski, R., & Eskin, N. A. M. (2011). Oil Composition and Properties. *Canola*, (pp. 189–227).
18. Augustyn, O. P. H., & Kock, J. L. F. (1989). Differentiation of yeast species, and strains within a species, by cellular fatty acid analysis. 1. Application of an adapted technique to differentiate between strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods*, 10(1), 9–23.
19. Shantha, N. C., & Napolitano, G. E. (1992). Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography A*, 624(1-2), 37–51.
20. Skinner, E. R., Watt, C., Besson, J. A. O., & Best, P. V. (1993). Differences in the fatty acid composition of the grey and white matter of different regions of the brains of patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Brain*, 116(3), 717–725.
21. Chaaba, R., Bouaziz, A., Ben Amor, A., Mnif, W., Hammami, M., & Mehri, S. (2023). Fatty acid profile and genetic variants of proteins involved in fatty acid metabolism could be considered as disease predictor. *Diagnostics*, 13(5), 979.
22. Molteberg, E. L., Vogt, G., Nilsson, A., & Frolich, W. (1995). Effects of storage and heat processing on the content and composition of free fatty acids in oats. *Cereal chemistry*, 72(1), 88-93.
23. Patel, A., Arora, N., Mehtani, J., Pruthi, V., & Pruthi, P. A. (2017). Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 604–616.
24. Tao, F., & Ngadi, M. (2017). Applications of spectroscopic techniques for fat and fatty acids analysis of dairy foods. *Current Opinion in Food Science*, 17, 100–112.
25. Amorim, T. L., Duarte, L. M., da Silva, E. M., & Oliveira, M. A. L. (2020). Capillary electromigration methods for fatty acids determination in vegetable and marine oils: a review. *Electrophoresis*, 42(3), 289-304.
26. Miwa, H. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids and esterified fatty acids in biological materials as their 2-nitrophenylhydrazides. *Analytica Chimica Acta*, 465(1-2), 237–255.
27. Dołowy, M., & Pyka, A. (2015). Chromatographic Methods in the Separation of Long-Chain Mono- and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–20.
28. Rosenfeld, J. M. (2002). Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta*, 465(1-2), 93–100.
29. Gutnikov, G. (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 71–89.
30. Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465(1-2), 39–62.
31. Ackman, R. G. (2002). The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century. *Analytica Chimica Acta*, 465(1-2), 175–192.
32. Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 113–131.
33. Skoog, D. A., Holler F. J., & Crouch S. R. (2000). Principios de análisis instrumental. (6ta. Edición) *McGraw Hill*. Madrid, España.

34. Guil-Guerrero, J. L., Gómez-Mercado, F., García-Maroto, F., & Campra-Madrid, P. (2000). Occurrence and characterization of oils rich in γ -linolenic acid. *Phytochemistry*, 53(4), 451–456.
35. Stránský, K., Zarevúcka, M., & Wimmer, Z. (2005). Gas chromatography analysis of blackcurrant oil in relation to its stability. *Food Chemistry*, 92(3), 569–573.
36. Nasri, N., Khaldi, A., Fady, B., & Triki, S. (2005). Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: Composition and population profiling. *Phytochemistry*, 66(14), 1729–1735.
37. Golay, P.-A., Giuffrida, F., Dionisi, F., & Destailats, F. (2009). Streamlined Methods for the Resolution and Quantification of Fatty Acids Including Trans Fatty Acid Isomers in Food Products by Gas Chromatography. *Journal of AOAC International*, 92(5), 1301–1309.
38. Ratnayake, W. N., Plouffe, L. J., Pasquier, E., & Gagnon, C. (2002). Temperature-sensitive resolution of cis-and trans-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and CP-Sil 88 capillary columns. *Journal of AOAC international*, 85(5), 1112-1118.
39. Mota, M. F. S., Waktola, H. D., Nolvachai, Y., & Marriott, P. J. (2021). Gas chromatography – mass spectrometry for characterisation, assessment of quality and authentication of seed and vegetable oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116238.
40. Ertaş, A., Boğa, M., Yılmaz, M. A., Yeşil, Y., Haşimi, N., Kaya, M. Ş., Temel, H., & Kolak, U. (2014). Chemical Compositions by Using LC-MS/MS and GC-MS and Biological Activities of *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4601–4609.
41. Topkafa, M., Kara, H., & Sherazi, S. T. H. (2015). Evaluation of the Triglyceride Composition of Pomegranate Seed Oil by RP-HPLC Followed by GC-MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(6), 791–800.
42. Altintas, A., Kosar, M., Kirimer, N., Baser, K. H. C., & Demirci, B. (2006). Composition of the essential oils of *Lycium barbarum* and *L. ruthenicum* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(1), 24–25.
43. Zhao, X., He, Y., Chen, J., Zhang, J., Chen, L., Wang, B., Wu, C., & Yuan, Y. (2021). Identification and direct determination of fatty acids profile in oleic acid by HPLC-CAD and MS-IT-TOF. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 204, 114238.
44. Liu, Y., Lotero, E., & Goodwin Jr, J. (2006). Effect of carbon chain length on esterification of carboxylic acids with methanol using acid catalysis. *Journal of Catalysis*, 243(2), 221–228.
45. Olvera-Ureña, E., Lopez-Tellez, J., Vizuetto, M. M., Hidalgo-Ledezma, J. G., Martinez-Quiroz, B., & Rodriguez, J. A. (2023). Lipase-Assisted Synthesis of Alkyl Stearates: Optimization by Taguchi Design of Experiments and Application as Defoamers. *Molecules*, 29(1), 195.
46. Lavilla, I., Romero, V., Costas, I., & Bendicho, C. (2014). Greener derivatization in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61, 1–10.
47. Pasha, M. K., Dai, L., Liu, D., Du, W., & Guo, M. (2021). Biodiesel production with enzymatic technology: progress and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(5), 1526–1548.
48. Lu, J., Deng, L., Nie, K., Wang, F., & Tan, T. (2012). Stability of Immobilized *Candidasp.* 99-125 Lipase for Biodiesel Production. *Chemical Engineering & Technology*, 35(12), 2120–2124.

49. Du, W., Xu, Y., Liu, D., & Zeng, J. (2004). Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(3-4), 125–129.
50. Mandari, V., & Devarai, S. K. (2022). Biodiesel production using homogeneous, heterogeneous, and enzyme catalysts via transesterification and esterification reactions: A critical review. *BioEnergy Research*, 15(2), 935-961.
51. Dettmer-Wilde, K. (2014). Derivatization. In *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference* (pp. 603-632).
52. Wang, T., Lim, J., Choi, S., Kang, H., & Lee, H. (2013). Comparative studies on derivatization methods of single or mixed fatty acids. *Food Science and Biotechnology*, 22(6), 1573–1579.
53. Vicente, G., Martinez, M., & Aracil, J. (2007). Optimisation of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. *Bioresource Technology*, 98(9), 1724–1733.
54. Jambulingam, R., Srinivasan, G. R., Palani, S., Munir, M., Saeed, M., & Mohanam, A. (2020). Process optimization of biodiesel production from waste beef tallow using ethanol as co-solvent. *SN Applied Sciences*, 2(8), 1-18.
55. Marinković, D. M., Stanković, M. V., Veličković, A. V., Avramović, J. M., Miladinović, M. R., Stamenković, O. O., Veljkovic, V. B., & Jovanović, D. M. (2016). Calcium oxide as a promising heterogeneous catalyst for biodiesel production: Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 1387-1408.
56. Gardy, J., Nourafkan, E., Osatiashtiani, A., Lee, A. F., Wilson, K., Hassanpour, A., & Lai, X. (2019). A core-shell SO₄/Mg-Al-Fe₃O₄ catalyst for biodiesel production. *Applied Catalysis B: Environmental*, 259, 118093.
57. Wang, H.-G., Shi, G.-L., Yu, F., & Li, R.-F. (2016). Mild synthesis of biofuel over a microcrystalline S₂O₈²⁻/ZrO₂ catalyst. *Fuel Processing Technology*, 145, 9–13.
58. Tavizón-Pozos, J. A., Chavez-Esquivel, G., Suárez-Toriello, V. A., Santolalla-Vargas, C. E., Luévano-Rivas, O. A., Valdés-Martínez, O. U., Talavera-López, A., & Rodríguez, J. A. (2021). State of Art of Alkaline Earth Metal Oxides Catalysts Used in the Transesterification of Oils for Biodiesel Production. *Energies*, 14(4), 1031.
59. Nurfidaus, M., Mohiddin, M. N. B., Tan, Y. H., Seow, Y. X., Kansedo, J., Mubarak, N. M., Abdullah, M. O., Chan, Y. S., & Khalid, M. (2021). Evaluation on feedstock, technologies, catalyst and reactor for sustainable biodiesel production: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 98, 60–81.
60. Du, L., Li, Z., Ding, S., Chen, C., Qu, S., Yi, W., Lu, J., & Ding, J. (2019). Synthesis and characterization of carbon-based MgO catalysts for biodiesel production from castor oil. *Fuel*, 258, 116122.
61. Singh, R., Bux, F., & Sharma, Y. C. (2020). Optimization of biodiesel synthesis from microalgal (*Spirulina platensis*) oil by using a novel heterogeneous catalyst, β-strontium silicate (β-Sr₂SiO₄). *Fuel*, 280, 118312.
62. Védrine, J. C. (2015). Acid–base characterization of heterogeneous catalysts: an up-to-date overview. *Research on Chemical Intermediates*, 41(12), 9387–9423.
63. Baxter, R. J., & Hu, P. (2002). Insight into why the Langmuir–Hinshelwood mechanism is generally preferred. *The Journal of Chemical Physics*, 116(11), 4379–4381.
64. Kuipers, E. W., Vardi, A., Danon, A., & Amirav, A. (1991). Surface-molecule proton transfer: A demonstration of the Eley-Rideal mechanism. *Physical Review Letters*, 66(1), 116–119.

65. Kouzu, M., & Hidaka, J. (2012). Transesterification of vegetable oil into biodiesel catalyzed by CaO: A review. *Fuel*, 93, 1–12.
66. Santos, S., Nobre, L., Gomes, J., Puna, J., Quinta-Ferreira, R., & Bordado, J. (2019). Soybean Oil Transesterification for Biodiesel Production with Micro-Structured Calcium Oxide (CaO) from Natural Waste Materials as a Heterogeneous Catalyst. *Energies*, 12(24), 4670.
67. Kouzu, M., Kasuno, T., Tajika, M., Sugimoto, Y., Yamanaka, S., & Hidaka, J. (2008). Calcium oxide as a solid base catalyst for transesterification of soybean oil and its application to biodiesel production. *Fuel*, 87(12), 2798–2806.
68. Ajala, E.O., Eletta, O.A., Ajala, M.A., & Oyeniyi, S.K. (2018). Characterization and evaluation of chicken eggshell for use as a bio-resource. *Arid Zone Journal of Engineering, Technology and Environment*, 14, 26-40.
69. Jayakumar, M., Karmegam, N., Gundupalli, M. P., Bizuneh Gebeyehu, K., Tessema Asfaw, B., Chang, S. W., Ravindran, B., & Kumar Awasthi, M. (2021). Heterogeneous base catalysts: Synthesis and application for biodiesel production – A review. *Bioresource Technology*, 331, 125054.
70. Yaşar, F. (2019). Biodiesel production via waste eggshell as a low-cost heterogeneous catalyst: Its effects on some critical fuel properties and comparison with CaO. *Fuel*, 255, 115828.
71. Yoo, S. J., Lee, H., Veriansyah, B., Kim, J., Kim, J.-D., & Lee, Y.-W. (2010). Synthesis of biodiesel from rapeseed oil using supercritical methanol with metal oxide catalysts. *Bioresource Technology*, 101(22), 8686–8689.
72. Esipovich, A., Danov, S., Belousov, A., & Rogozhin, A. (2014). Improving methods of CaO transesterification activity. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 395, 225–233.
73. Watkins, R. S., Lee, A. F., & Wilson, K. (2004). Li–CaO catalysed tri-glyceride transesterification for biodiesel applications. *Green Chemistry*, 6(7), 335–340.
74. Khatibi, M., Khorasheh, F., & Larimi, A. (2020). Biodiesel production via transesterification of canola oil in the presence of Na–K doped CaO derived from calcined eggshell. *Renewable Energy*, 163, 1626-1636.
75. MacLeod, C. S., Harvey, A. P., Lee, A. F., & Wilson, K. (2008). Evaluation of the activity and stability of alkali-doped metal oxide catalysts for application to an intensified method of biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 135(1-2), 63–70.
76. Kumar, D., & Ali, A. (2012). Nanocrystalline K–CaO for the transesterification of a variety of feedstocks: Structure, kinetics and catalytic properties. *Biomass and Bioenergy*, 46, 459–468.
77. Čapek, L., Hájek, M., Kutálek, P., & Smoláková, L. (2014). Aspects of potassium leaching in the heterogeneously catalyzed transesterification of rapeseed oil. *Fuel*, 115, 443–451.
78. Tangy, A., Pulidindi, I. N., Dutta, A., & Borenstein, A. (2020). Strontium Oxide Nanoparticles for Biodiesel Production: Fundamental Insights and Recent Progress. *Energy & Fuels*, 35(1), 187–200.
79. Sudsakorn, K., Saiwuttikul, S., Palitsakun, S., Seubsai, A., & Limtrakul, J. (2017). Biodiesel production from *Jatropha Curcas* oil using strontium-doped CaO/MgO catalyst. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), 2845–2852.
80. Li, H., Niu, S., Lu, C., & Li, J. (2016). Calcium oxide functionalized with strontium as heterogeneous transesterification catalyst for biodiesel production. *Fuel*, 176, 63–71.

81. Hossain, M., Muntaha, N., Osman Goni, L. K. M., Jamal, M. S., Gafur, M. A., Islam, D., & Fakhruddin, A. N. M. (2021). Triglyceride conversion of waste frying oil up to 98.46% using low concentration K⁺/CaO catalysts derived from eggshells. *ACS omega*, 6(51), 35679-35691.
82. Palitsakun, S., Koonkuer, K., Topool, B., Seubsai, A., & Sudsakorn, K. (2021). Transesterification of Jatropha oil to biodiesel using SrO catalysts modified with CaO from waste eggshell. *Catalysis Communications*, 149, 106233.
83. Hernández-Martínez, M. A., Rodríguez, J. A., Chavez-Esquivel, G., Ángeles-Beltrán, D., & Tavizón-Pozos, J. A. (2023). Canola oil transesterification for biodiesel production using potassium and strontium supported on calcium oxide catalysts synthesized from oyster shell residues, *Next Materials*, 1(4), 100033.
84. Shinde, K., & Kaliaguine, S. (2019). A comparative study of ultrasound biodiesel production using different homogeneous catalysts. *chemengineering*, 3(1), 18.
85. Li, S., Kwofie, E. M., & Ngadi, M. (2020). Comparative Evaluation of Thermogravimetric and Refractive Index Techniques in Determining Biodiesel Yield. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 10(1), 30-42.
86. Alimentarius, C. (2015). codex Stan 192, 1995. *Norme générale Codex pour les additifs alimentaires*.
87. Roschat, W., Siritanon, T., Yoosuk, B., & Promarak, V. (2016). Biodiesel production from palm oil using hydrated lime-derived CaO as a low-cost basic heterogeneous catalyst. *Energy Conversion and Management*, 108, 459–467.
88. Xu, C., Enache, D. I., Lloyd, R., Knight, D. W., Bartley, J. K., & Hutchings, G. J. (2010). Mgo Catalysed Triglyceride Transesterification for Biodiesel Synthesis. *Catalysis Letters*, 138(1-2), 1–7.
89. Prasetyo, A. B., Maksun, A., Soedarsono, J. W., & Firdiyono, F. (2019). Thermal characteristics of ferronickel slag on roasting process with addition of sodium carbonate (Na₂CO₃). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 541, 012037.
90. Huang, H., & Liu, Z. (2013). Transesterification of glyceryl tributyrates with methanol using strontium borate as the solid base catalyst. *Science China Chemistry*, 56(12), 1727–1734.
91. Anbia, M., Masoomi, S., Sedaghat, S., & Sepehrian, M. (2019). Potassium halides-impregnated eggshell as a heterogeneous nanocatalysts for biodiesel production. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 7(1), 103-108.
92. Habte, L., Shiferaw, N., Mulatu, D., Thenepalli, T., Chilakala, R., & Ahn, J. W. (2019). Synthesis of nano-calcium oxide from waste eggshell by sol-gel method. *Sustainability*, 11(11), 3196.
93. Kim, T., & Olek, J. (2012). Effects of Sample Preparation and Interpretation of Thermogravimetric Curves on Calcium Hydroxide in Hydrated Pastes and Mortars. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, 2290(1), 10–18.
94. Teo, S. H., Taufiq-Yap, Y. H., Rashid, U., & Islam, A. (2015). Hydrothermal effect on synthesis, characterization and catalytic properties of calcium methoxide for biodiesel production from crude Jatropha curcas. *RSC Advances*, 5(6), 4266–4276.
95. Culas, S., Surendran, A., & Samuel, J. (2013). Kinetic studies of the non-isothermal decomposition of strontium nitrate. *Asian Journal of Chemistry*, 25(7), 3855.

96. Davar, F., Salavati-Niasari, M., & Baskoutas, S. (2011). Temperature controlled synthesis of SrCO₃ nanorods via a facile solid-state decomposition route starting from a novel inorganic precursor. *Applied Surface Science*, 257(9), 3872–3877.
97. Olivares, R. I., & Edwards, W. (2013). LiNO₃–NaNO₃–KNO₃ salt for thermal energy storage: Thermal stability evaluation in different atmospheres. *Thermochimica Acta*, 560, 34–42.
98. Hogan, V. D., & Gordon, S. (1961). Thermoanalysis of Binary Systems. Potassium Perchlorate-Alkali and Alkaline Earth Metal Nitrates. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 6(4), 572–578.
99. Guth, U., Babwisch, F., Wulff, H., & Möbius, H.-H. (1986). Electrical Conductivity and Crystal Structure of Pure and SrCO₃-doped K₂CO₃. *Crystal Research and Technology*, 21(3), 431–435.
100. Erchamo, Y. S., Mamo, T. T., Workneh, G. A., & Mekonnen, Y. S. (2021). Improved biodiesel production from waste cooking oil with mixed methanol–ethanol using enhanced eggshell-derived CaO nano-catalyst. *Scientific Reports*, 11(1), 6708.
101. Saoud, K. M., Ibala, I., El Ladki, D., Ezzeldeen, O., & Saeed, S. (2014). Microwave assisted preparation of calcium hydroxide and barium hydroxide nanoparticles and their application for conservation of cultural heritage. In *Digital Heritage. Progress in Cultural Heritage: Documentation, Preservation, and Protection: 5th International Conference, EuroMed 2014, Limassol, Cyprus, November 3-8, 2014. Proceedings 5* (pp. 342-352).
102. Tanpure, S., Ghanwat, V., Shinde, B., Tanpure, K., & Lawande, S. (2022). The Eggshell Waste Transformed Green and Efficient Synthesis of K-Ca(OH)₂ Catalyst for Room Temperature Synthesis of Chalcones. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42(4), 1322–1340.
103. Madhu, B. J., Bhagyalakshmi, H., Shruthi, B., & Veerabhadraswamy, M. (2021). Structural, AC conductivity, dielectric and catalytic behavior of calcium oxide nanoparticles derived from waste eggshells. *SN Applied Sciences*, 3(6), 637.
104. Mohamed, F., Shaban, M., Aljohani, G., & Ahmed, A. M. (2021). Synthesis of novel eco-friendly CaO/C photocatalyst from coffee and eggshell wastes for dye degradation. *Journal of Materials Research and Technology*, 14, 3140–3149.
105. Lu, P., Hu, X., Li, Y., Zhang, M., Liu, X., He, Y., Dong, F., Fu, M., & Zhang, Z. (2018). One-step preparation of a novel SrCO₃/g-C₃N₄ nano-composite and its application in selective adsorption of crystal violet. *RSC Advances*, 8(12), 6315–6325.
106. Zhang, W., Yu, Y., & Yi, Z. (2017). Controllable synthesis of SrCO₃ with different morphologies and their co-catalytic activities for photocatalytic oxidation of hydrocarbon gases over TiO₂. *Journal of Materials Science*, 52(9), 5106–5116.
107. Saleh, S. H., & Tripp, C. P. (2021). Measurement of water concentration in oils using CaO powder and infrared spectroscopy. *Talanta*, 228, 122250.
108. Naemchanthara, K., Meejoo, S., Onreabroy, W., & Limsuwan, P. (2008). Temperature effect on chicken egg shell investigated by XRD, TGA and FTIR. *Advanced Materials Research*, 55, 333-336.
109. Pornchai, T., Putkham, A. I., & Putkham, A. (2016). Effect of calcination time on physical and chemical properties of CaO-catalyst derived from industrial-eggshell wastes. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*, 35(6), 693-697.

110. Kavitha, V., Geetha, V., & Jacqueline, P. J. **(2019)**. Production of biodiesel from dairy waste scum using eggshell waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 125, 279–287.
111. Prokaewa, A., Meejoo Smith, S., Luengnaruemitchai, A., Kandiah, M., & Boonyuen, S. **(2022)**. Biodiesel production from waste cooking oil using a new heterogeneous catalyst SrO doped CaO nanoparticles. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 32(1), 79–85.