

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**TESIS**

“

**“RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL  
DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*) MEDIANTE ARRASTRE DE  
VAPOR”**

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTADO POR**

**AROSQUIPA MITA ABEL  
VILLOSLADA SALAZAR SEGUNDO**

**ASESOR**

**Dr. CARRASCO VENEGAS LUIS AMÉRICO**

**CALLAO – 2023**

**PERÚ**



## Document Information

Analyzed document	TESIS - AROSQUIPA MITA Y VILLOSLADA SALAZAR.pdf (D162665485)
Submitted	3/30/2023 5:37:00 PM
Submitted by	
Submitter email	
Similarity	0.5%
Analysis address	fiq.investigacion.unac@analysis.orkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Mejoramiento de reactores para la producción de biodisel.docx</b> Document Mejoramiento de reactores para la producción de biodisel.docx (D50390993)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>submission.docx</b> Document submission.docx (D54456112)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>TFG_Juan Vidal Díaz_YP_v2.docx</b> Document TFG_Juan Vidal Díaz_YP_v2.docx (D115369146)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>TESIS - PETROQUIMICA - BASANTES ANDRE.docx</b> Document TESIS - PETROQUIMICA - BASANTES ANDRE.docx (D77336991)		<b>3</b>
<b>SA</b>	<b>AAvellan 2019 17 julio 2019 Final Version to Reviewers.docx</b> Document AAvellan 2019 17 julio 2019 Final Version to Reviewers.docx (D54481652)		<b>2</b>
<b>SA</b>	<b>Proyecto Integrador, Primero B, Andrés Velásquez, Davis Tandazo.pdf</b> Document Proyecto Integrador, Primero B, Andrés Velásquez, Davis Tandazo.pdf (D35819671)		<b>1</b>

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA "RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ESPINACA (Spinacia oleracea) MEDIANTE ARRASTRE DE VAPOR" TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO ABEL AROSQUIPA MITA SEGUNDO VILLOSLADA SALAZAR LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA Callao, 2023 PERÚ

INFORMACIÓN BÁSICA FACULTAD Ingeniería Química UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Facultad de Ingeniería Química TÍTULO Rendimiento de la extracción de aceite esencial de espinaca (spinacia oleracea) mediante arrastre de vapor AUTORES • Abel Arosquipa Mita • Segundo Villoslada Salazar ASESOR • Luis Américo Carrasco Venegas LUGAR DE EJECUCIÓN Laboratorio de Investigación de la empresa Ages Ingenieros S.A.C. UNIDAD DE ANÁLISIS Hojas de espinaca TIPO DE INVESTIGACIÓN Experimental

HOJA DE REFERENCIA DEL JURADO Y APROBACIÓN

DEDICATORIA Segundo Villoslada: Dedico con todo mi corazón esta tesis a mis padres, por haberme forjado como una persona con valores y por el apoyo espiritual. A mis hermanos y familia en general, por el apoyo que siempre me brindaron en el transcurso de mi carrera universitaria. Abel Arosquipa: Dedico este trabajo a mis padres, quienes siempre se esforzaron por sus hijos. También quiero dedicar esta tesis a mis hijas y esposa, que fueron siempre mi motivo para seguir adelante.

## INFORMACIÓN BÁSICA

**FACULTAD:** Ingeniería Química.

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN:** Facultad de Ingeniería Química.

**TÍTULO:** “Rendimiento de la extracción de aceite esencial de espinaca (*spinacia oleracea*) mediante arrastre de vapor”.

**AUTORES:**

- Abel Arosquipa Mita / DNI: 42787107
- Segundo Villoslada Salazar / DNI: 42839672

**ASESOR:**

- Luis Américo Carrasco Venegas / ORCID: 0000-0002-7832-3366 / DNI: 25825871

**LUGAR DE EJECUCIÓN:** Laboratorio de Investigación de la empresa Ages Ingenieros S.A.C.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** Rendimiento de extracción de hojas de espinaca

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Experimental

**TEMA OCDE:** 2.4.2. Ingeniería de Procesos

## PRÓLOGO DEL JURADO

La presente Tesis fue sustentada por los Bachilleres **AROSQUIPA MITA ABEL** y **VILLOSLADA SALAZAR SEGUNDO** ante el Jurado de Sustentación de Tesis conformado por los siguientes docentes ordinarios de la Universidad Nacional del Callao:

ING° MEDINA COLLANA JUAN TAUMATURGO	Presidente
ING° MACHACA GONZALES LEONARDO FELIX	Secretario
Lic. ALVARADO BRAVO NESTOR MARCIAL	Vocal
ING° CARRASCO VENEGAS LUIS AMÉRICO	Asesor

Tal como está asentado en el Libro de actas N° 02 Folio N° 150 y Acta N° 331 de fecha 10 de AGOSTO del 2023, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Tesis sin Ciclo de Tesis, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 27 del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Callao, aprobado por Resolución de Consejo Universitario N° 099–2021–CU del 30 de junio de 2021

## DEDICATORIA

Segundo Villoslada:

*Dedico con todo mi corazón esta tesis a mis padres, por haberme forjado como una persona con valores y por el apoyo espiritual.*

*A mis hermanos y familia en general, por el apoyo que siempre me brindaron en el transcurso de mi carrera universitaria.*

Abel Arosquipa:

*Dedico este trabajo a mis padres, quienes siempre se esforzaron por sus hijos. También quiero dedicar esta tesis a mis hijas y esposa, que fueron siempre mi motivo para seguir adelante.*

## **AGRADECIMIENTO**

Nuestro agradecimiento a Dios y a la Universidad Nacional del Callao (UNAC), que nos abrió sus puertas para formarnos profesionalmente.

A nuestro asesor Dr. Luis Carrasco Venegas, por su tiempo y paciencia, a lo largo de todo este tiempo en el que hemos trabajado juntos.

A nuestros profesores, por sus enseñanzas y porque fueron quienes nos incentivaron a seguir adelante.

Y a todas aquellas personas que siempre estuvieron a nuestro lado, en cada momento.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>11</b>
1.1. Descripción de la realidad problemática .....	11
1.2. Formulación del problema (problema general y específicos).....	11
1.3. Objetivos (objetivo general y específicos).....	12
1.4. Justificación .....	12
1.5. Delimitantes de la investigación (teórico, temporal, espacial).....	13
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1. Antecedentes (internacional y nacional) .....	14
2.2. Bases teóricas .....	19
2.2.1. Extracción por arrastre de vapor .....	19
2.2.2. Aceites esenciales.....	21
2.2.3. Composición química de los aceites esenciales .....	23



2.2.4.	Mecanismo de extracción del aceite esencial .....	24
2.3.	Marco conceptual.....	26
2.3.1.	Espinaca.....	26
2.3.2.	Superficie de respuesta.....	28
2.4.	Definición de términos básicos .....	29
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS Y VARIABLES .....</b>	<b>31</b>
3.1.	Hipótesis (general y específicas) .....	31
3.1.1.	Operacionalización de variables.....	31
<b>IV.</b>	<b>METODOLÓGÍA DEL PROYECTO .....</b>	<b>32</b>
4.1.	Diseño metodológico.....	32
4.2.	Método de investigación .....	34
4.3.	Población y muestra.....	34
4.4.	Lugar de estudio y período desarrollado.....	34
4.5.	Técnicas e instrumentos para la recolección de la información .....	35
4.6.	Análisis y procesamiento de datos.....	40
4.7.	Aspectos éticos en investigación .....	42
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1.	Resultados descriptivos .....	43
5.2.	Resultados inferenciales .....	46
5.2.1.	Rendimiento de extracción .....	46
5.2.2.	Pruebas químicas y fisicoquímicas.....	46

5.3. Otro tipo de resultados estadísticos.....	48
<b>VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
6.1. Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados .....	53
6.1.1. Contrastación de hipótesis general .....	53
6.1.2. Contrastación de hipótesis específicas .....	53
6.2. Contrastación de resultados con otros estudios similares .....	53
6.3. Responsabilidad ética de acuerdo a los reglamentos vigentes.....	54
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>VIII.RECOMENDACIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables .....	31
Tabla 2. Diseño experimental para las pruebas de extracción por arrastre de vapor.....	33
Tabla 3. Datos obtenidos en las pruebas experimentales y el rendimiento de extracción.....	43
Tabla 4. Datos de contenido de ácido fólico en las muestras de aceite esencial de espinaca.....	44
Tabla 5. Datos de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en las muestras de aceite esencial de espinaca.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aceites esenciales.....	23
Figura 2. La espinaca.....	26
Figura 3. Cultivos de espinaca.....	27
Figura 4. Diseño de la investigación.....	32
Figura 5. Recepción de la espinaca fresca.....	35
Figura 6. Hojas de espinaca lavadas y secas.....	35
Figura 7. Corte de las hojas de espinaca.....	36
Figura 8. Hojas semisecas de espinaca en cuadros.....	37
Figura 9. Equipo de extracción por arrastre con vapor.....	37
Figura 10. Mezcla obtenida (fase acuosa y oleosa) .....	40
Figura 11. Separación en la pera de decantación.....	40
Figura 12. Muestras de aceite esencial de espinaca.....	41
Figura 13. Rendimiento de las pruebas de extracción.....	46
Figura 14. Contenido de ácido fólico en las muestras de aceite esencial de espinaca.....	47
Figura 15. Densidad de las muestras de aceite esencial de espinaca.....	47
Figura 16. Índice de refracción de las muestras de aceite esencial de espinaca.....	48
Figura 17. Acidez titulable de las muestras de aceite esencial de espinaca.....	48
Figura 18. Rendimiento vs Corte de la hoja; tiempo – Para hoja fresca.....	49
Figura 19. Rendimiento vs Corte de la hoja; tiempo – Para hoja semiseca.....	49
Figura 20. Rendimiento vs Corte de la hoja; tiempo – Para hoja seca.....	50

Figura 21. Contenido de ácido fólico vs Corte de la hoja; tiempo – Para hoja fresca.....	51
Figura 22. Contenido de ácido fólico vs Corte de la hoja; tiempo – Para hoja semiseca.....	51
Figura 23. Contenido de ácido fólico vs Corte de la hoja; tiempo – Para hoja seca.....	52
Figura 24. Optimización de las condiciones de operación.....	52

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

AOCS: Association of Analytical Communities (Asociación de Comunidades Analíticas)

UV: Ultravioleta

## RESUMEN

El uso de aceites esenciales actualmente está en constante crecimiento, tanto a nivel nacional, como internacional. Esto se debe a que dichos aceites, provenientes de distintos tipos de materia prima cuentan con propiedades particulares. Algunos de ellos se utilizan en aromaterapia, así como hay otros que se consumen para aprovechar sus beneficios en nuestro organismo. Uno de estos aceites es el de espinaca (materia prima de conocidos beneficios), y que se ha estudiado escasamente. Ante esto, en esta investigación se buscó determinar el rendimiento de extracción de su aceite esencial utilizando la destilación por arrastre de vapor. Se hicieron variaciones en el corte de la hoja de espinaca, su condición de humedad y el tiempo de extracción. El rendimiento obtenido fue de 0.35%. Finalmente, las mejores condiciones de extracción del aceite esencial de espinaca se dieron cuando el tiempo de extracción fue cercano a los 70 minutos. Las condiciones de la hoja para obtener esos resultados deben ser de 1.63 cm<sup>2</sup> y para una condición de hoja semiseca.

Palabras clave: Espinaca, destilación, aceite esencial

## **ABSTRACT**

The use of essential oils is currently constantly growing, both nationally and internationally. This is because these oils, coming from different types of raw materials, have particular properties. Some of them are used in aromatherapy, as well as others that are consumed to take advantage of their benefits in our body. One of these oils is spinach (raw material with known benefits), and which has been scarcely studied. Given this, this research sought to determine the extraction yield of its essential oil using steam distillation. Variations were made in the cut of the spinach leaf, its humidity condition and the extraction time. The yield obtained was 0.35%. Finally, the best extraction conditions for spinach essential oil occurred when the extraction time was close to 70 minutes. The leaf conditions to obtain these results must be 1.63 cm<sup>2</sup> and for a semi-dry leaf condition.

Keywords: Spinach, distillation, essential oil



## INTRODUCCIÓN

La presente investigación aborda la determinación del rendimiento de extracción del aceite esencial de espinaca, por medio de la destilación por arrastre de vapor. Como antecedente se tiene la extracción de una amplia variedad de aceites esenciales obtenidos con el uso de la misma técnica.

De acuerdo con la literatura, los aceites esenciales tienen una amplia variedad de aplicaciones, de acuerdo a la materia prima con la que se hayan elaborado. En algunos casos funcionan como agentes antibacterianos, en otros casos son parte principal de la aromaterapia, y en otros casos se consumen directamente para solucionar algunos problemas de salud (gastrointestinales, sistema nervioso, entre otros) [1,2].

En esta última categoría se encuentra el aceite esencial de espinaca, ya que la materia prima tiene una gran variedad de nutrientes importantes para la dieta; especialmente el ácido fólico. Mediante la obtención del aceite esencial de espinaca se pretende promover su consumo en una presentación alternativa.

El proceso consiste en preparar la materia prima para ponerla en contacto con el vapor de agua, que arrastrará las sustancias orgánicas componentes del aceite esencial de la espinaca. El vapor se condensa y luego se separa físicamente, para luego hacer los análisis respectivos.

La principal dificultad para el desarrollo del trabajo se presenta por la escasez de bases teóricas sobre la espinaca, pero se subsanaron utilizando semejanzas con materias primas similares.

## **I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. Descripción de la realidad problemática**

Los aceites esenciales son extractos obtenidos de plantas. Las plantas están hechas de materiales estructurales y fitoquímicos. Estos productos químicos tienen propiedades que no solo benefician a la planta, sino que también benefician a las personas.

Los aceites esenciales se pueden usar en aromaterapia, un tipo de medicina complementaria que usa el olfato para mejorar su salud o se pueden aplicar tópicamente sobre la piel. También algunos tipos se pueden consumir directamente, como el proveniente de la espinaca. Esta materia prima es producida en nuestro país y cuenta con una cantidad muy importante de ácido fólico y otros nutrientes que no se encuentran por lo general en la dieta. A pesar de ello no tiene tanta difusión en nuestro medio (como vegetal tampoco sus productos derivados) en comparación con otros vegetales. Ante esto, surge la necesidad de promover alternativamente el consumo de espinaca, por medio de su aceite esencial, que tampoco ha sido muy estudiado, a diferencia de los aceites provenientes de otras materias primas.

### **1.2. Formulación del problema (problema general y específicos)**

#### **Problema general**

¿Cuál será el rendimiento óptimo de extracción de aceite de espinaca mediante el arrastre por vapor?

### **Problemas específicos**

¿En qué condiciones deben estar las hojas de espinaca para someterlas al proceso de extracción de aceite esencial?

¿Cuáles son las condiciones de extracción para la obtención de aceite esencial de espinaca?

### **1.3. Objetivos (objetivo general y específicos)**

#### **Objetivo general**

Determinar el rendimiento óptimo de extracción de aceite de espinaca mediante el arrastre por vapor.

#### **Objetivos específicos**

Determinar las condiciones de la espinaca sometida al proceso de extracción.

Determinar las condiciones de extracción favorables para la obtención de aceite esencial de espinaca.

### **1.4. Justificación**

La espinaca es un vegetal que se puede considerar de consumo masivo, y posee además características funcionales por su alto contenido de potasio, vitaminas y especialmente ácido fólico. Por lo que lograr conocer las mejores posibilidades de extracción de uno de sus derivados permitiría acercar aún más este producto a la población. Por otro lado, esta investigación nos permite aplicar tecnología al tratamiento de una materia prima que no ha sido lo suficiente estudiada, en cuanto a su aceite esencial.

Finalmente, el trabajo queda sustentado económicamente por la creciente demanda de productos naturales, especialmente aceites esenciales. Estos forman parte de una nueva cultura ligada a la medicina natural, que ya se encuentra como parte del día a día de muchas personas.

### **1.5. Delimitantes de la investigación (teórico, temporal, espacial)**

#### **Teórico**

La presente investigación se enmarcó dentro de la teoría de aceites esenciales provenientes de vegetales, específicamente de espinaca (*spinacia oleracea*). Además, se encuentra dentro del estudio de transferencia de masa, en el apartado de extracción por arrastre.

#### **Temporal**

Esta investigación se encuentra delimitada temporalmente entre los meses de octubre y diciembre de 2022.

#### **Espacial**

La investigación se realizó con espinaca proveniente de la región La Libertad. Las pruebas se realizaron en los laboratorios de la empresa Ages Ingenieros S.A.C.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes (internacional y nacional)

En la investigación titulada “Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (*Mentha spicata*) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor”, determinó las densidades y las propiedades organolépticas (como color, olor y aspecto), del aceite esencial e hidrolato obtenido. Posterior a la prueba a escala piloto, elaboró un balance de materia con flujos másicos, en los equipos utilizados como son: caldera, extractor, condensador y separador de fases, obteniendo así, un diagrama de flujo general del proceso. Efectuó también un balance de energía, determinando el calor suministrado por la caldera, y el calor perdido del condensador, mediante un análisis por cálculos termodinámicos. Por último, hizo el cálculo del rendimiento del aceite esencial obtenido en los procesos; obtuvo una cantidad considerable de hidrolato, a nivel laboratorio y escala piloto, durante un tiempo de extracción corto. Volumen de Hidrolato (laboratorio) = 398.9 mL, Volumen de Hidrolato (escala piloto) = 5001 mL.[3]

En la investigación titulada “Extracción de aceites esenciales de mandarina (*Citrus reticulata*) y palo santo (*Bursera graveolens*) por el método de arrastre de vapor”, tuvieron como objetivo extraer aceites esenciales de palo santo y de mandarina mediante el método de extracción por arrastre de vapor, para lo cual, realizaron el diseño, construcción y experimentación de un equipo a escala banco, implementando cálculos y fundamentos ingenieriles obtenidos de diferentes fuentes bibliográficas. Las pruebas que realizaron en el equipo

diseñado para la destilación por arrastre de vapor a escala banco presentaron los siguientes resultados: palo santo con rendimientos del 2,7985% y de 4,3425%, mientras que, la cáscara de mandarina obtuvo un rendimiento de 0,0816%, lo cual indica un resultado muy bajo en comparación al palo santo; sin embargo, comparado con otras investigaciones la extracción de aceite de mandarina obtuvo un mayor rendimiento.[4]

En la investigación titulada “Extracción, caracterización y aplicación de aceite esencial de plantas nativas palestinas”, realizaron un estudio del efecto de los aceites extraídos de tres plantas diferentes (adelfa, rutagraveolens y albahaca) contra insectos como los ácaros *Sitophilus granaria*, Mosquito y Varroa. Las plantas las recolectaron del Centro NARC, donde se seleccionaron a través del proceso de floración y luego las llevaron al laboratorio para extraer los aceites. Tomaron 800 g de cada planta y las cortaron en pequeños trozos, las remojaron con etanol durante 48 horas y luego filtraron el solvente y lo evaporaron para obtener el aceite extraído. Realizaron análisis tanto por TLC como por GC-MS para identificar los compuestos orgánicos.[5]

En la investigación “Extracción de aceite esencial de orégano mediante arrastre de vapor”, tuvieron como objetivo obtener el aceite esencial de orégano mediante la técnica de arrastre de vapor, con la finalidad de aprovechar sus cualidades organolépticas, antimicrobianas, y detoxificantes para el uso en la industria alimenticia, debido a que es una importante planta aromática que no se está aprovechando en su totalidad para beneficio del ser humano y se usa solamente como aditivo alimentario en la dieta tradicional de la gente de Ecuador. Para el experimento usaron 5 réplicas de 60g de orégano seco con (13%) de humedad,

a partir del aceite esencial obtenido determinaron un rendimiento promedio de 0.5 mL (0.83%), que se considera óptimo.[6]

En la investigación titulada “Extracción y caracterización del aceite esencial de salvia (*Salvia sagittata*) mediante destilación con arrastre de vapor”, tuvieron como objetivo la extracción y caracterización de aceite esencial de salvia (*Salvia Sagittata*) a partir de las hojas de la planta mediante un proceso de destilación por arrastre de vapor. Las muestras experimentales fueron hojas de salvia procedente de Cochac, distrito de la ciudad de Huaraz, Ancash trabajadas a diferentes condiciones de humedad (húmeda, semiseca y seca) y tamaño de partícula (hoja entera, 1/2 de hoja y 1/4 de hoja). Realizaron 9 corridas experimentales de las cuales obtuvieron diferentes porciones de destilado siendo el mayor rendimiento 0.40392% a la condición seca y cortada a 1/4 de hoja, asimismo, determinaron estadísticamente mediante al análisis de varianza (ANOVA) que la humedad tiene mayor significancia en el rendimiento. Las porciones obtenidas fueron sometidas a un análisis cromatográfico del cual se determinó que los componentes principales del aceite esencial de la *Salvia Sagittata* son: Linalool ( $C_{10}H_{18}O$ ) (23.22%); Cariofileno ( $C_{15}H_{24}$ ) (10.79%) y Canfeno ( $C_{10}H_{16}$ ) (6.16%).[7]

En la investigación titulada “Parámetros óptimos de operación en la extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) con el equipo modular de extracción de aceites esenciales”, tuvo como objetivo optimizar la extracción de aceite del eucalipto. La extracción la realizó empleando el equipo modular de extracción de aceites esenciales en el laboratorio de Transferencia de Masa de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de San Cristóbal

de Huamanga. Para el estudio de los efectos de las variables óptimas de operación de extracción de aceite esencial de eucalipto a partir de sus hojas determinando la máxima extracción por el método de optimización de la sección dorada con una secuencia experimental de estos cuatro factores: 1) porcentaje de flujo de vapor de agua inyectado, en cuatro niveles (50%, 60%, 80% y 90%). 2) Altura de carga de lecho, en cuatro niveles (15 cm, 30cm, 45cm y 60 cm) 3) tamaño de partícula en cuatro niveles (10 cm, 5 cm, 2,5 cm, 1,25 cm) 4) determinación del tiempo óptimo de extracción en 30 minutos, 45 minutos. 60 minutos y 75 minutos. En cada una de las combinaciones realizó un análisis exhaustivo e interpretación individual de los resultados experimentales. Las variables óptimas para la extracción del aceite esencial del eucalipto por arrastre con vapor de agua a nivel planta piloto para un lote 3,00 kg/batch son: porcentaje de flujo de vapor de agua al 81.4%, tamaño de partícula 1,25 cm equivalente al tamaño de hojas cortado en ocho partes, altura de carga de lecho equivalente a la mitad del diámetro del tanque de extracción (32 cm, columna vertical) y el tiempo óptimo de operación fue de 60 minutos.[8]

En la investigación titulada “Obtención y caracterización del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) procedente del distrito de Mala-Lima”, tuvieron como objetivo extraer y caracterizar el aceite esencial de Romero. El tiempo de cosecha del romero es importante porque a determinada hora del día los aceites esenciales se encuentran en mayor proporción en la planta y esto es aprovechado para obtener mayor rendimiento, al ser una variable poco estudiada se brinda un nuevo aporte para la obtención de estos aceites. Al realizar corridas experimentales obtuvieron aceite esencial de romero, siendo el de mayor



rendimiento el de la cosecha de medio día con 0.6473% de aceite esencial con respecto a la materia vegetal, usando 1.5 kg de romero, 3 cm de tamaño de partícula y 3000 mL de agua como solvente. Los resultados de la caracterización fueron: densidad 0.873 g/mL, índice de acidez 3.917 mg KOH/ g de aceite, índice de éster 31.02 mg KOH/ g de aceite. El resultado de la cromatografía de gases masas da 44 componentes volátiles, siendo el de mayor porcentaje el alfa pineno con 24.69%. [1]

En la investigación titulada “Modelado matemático de la extracción de aceite esencial de eucalipto *Eucalyptus globulus* s.p. por destilación con vapor de agua”. Utilizaron las hojas de eucalipto jóvenes entre 10 a 12 años con un tamaño promedio de 15 metros de altura, procedentes de la ciudad de Puno. Las hojas fueron procesadas de acuerdo al diseño experimental establecido de 23, a dos niveles y dos factores; teniendo como variables del estudio: tamaños de hojas,  $X_1$  (partidos y enteros), tiempo de secado,  $X_2$  (1 y 10 días) y tiempo de extracción,  $X_3$  (30 y 50 minutos). El resultado para el modelo matemático en cuanto a los valores óptimos de extracción: tamaño de hojas partidas, tiempo de secado de 10 días y tiempo de extracción de 50 minutos. La composición química del aceite esencial la determinaron mediante el cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrofotómetro de masa, dando como resultado 63,96% en contenido de cineol; los análisis fisicoquímicos no indican que los parámetros de densidad, densidad relativa e índice de refracción, si se encuentran dentro de los rangos establecidos por las normas técnicas peruanas (NTP) dados por el Indecopi. [9]

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Extracción por arrastre de vapor**

La extracción por arrastre de vapor es un método de separación que utiliza vapor para arrastrar compuestos volátiles desde una muestra sólida o líquida hacia una fase vaporizada. Este proceso se basa en las diferencias en las presiones de vapor y las afinidades químicas entre los componentes de la muestra. La técnica se utiliza comúnmente en la purificación y concentración de sustancias aromáticas, aceites esenciales y otros compuestos volátiles.

El proceso involucra una serie de etapas:

1. Generación de vapor: Se calienta agua para generar vapor. La temperatura y la presión del sistema determinarán la cantidad de vapor producida.
2. Arrastre de los compuestos: El vapor caliente fluye a través de la muestra, volatilizándolo los compuestos deseados. Estos compuestos se mezclan con el vapor y se arrastran fuera de la muestra.
3. Condensación: La mezcla vapor-compuesto se enfría y condensa, lo que provoca la separación de los compuestos volátiles del vapor. Esto generalmente se logra utilizando un condensador.
4. Recuperación: Los compuestos condensados se recogen en un recipiente. Debido a las diferencias en las presiones de vapor y las afinidades químicas, los compuestos volátiles se separan de los componentes no volátiles presentes en la muestra.

Las bases teóricas detrás de la extracción por arrastre de vapor incluyen la Ley de Raoult y la Ley de Dalton. La Ley de Raoult establece que la presión parcial de un componente en una solución es proporcional a su fracción molar en la

solución y su presión de vapor en estado puro. La Ley de Dalton, por otro lado, establece que la presión total de una mezcla de gases es igual a la suma de las presiones parciales de los gases individuales.

Es importante tener en cuenta las propiedades de los compuestos volátiles, como sus puntos de ebullición y presiones de vapor, para ajustar las condiciones de temperatura y presión durante el proceso de extracción por arrastre de vapor y lograr una separación efectiva.

Las materias primas más comunes para la extracción por arrastre de vapor incluyen:

- Aceites esenciales: Este es uno de los usos más conocidos de la extracción por arrastre de vapor. Se emplea para extraer aceites esenciales de plantas aromáticas, como lavanda, menta, eucalipto y rosa. El vapor arrastra los aceites esenciales de las plantas y luego se condensan para obtener los aceites en su forma concentrada.
- Extractos naturales: Se utilizan en la producción de sabores y fragancias naturales. Algunos compuestos aromáticos son muy sensibles al calor y pueden dañarse durante procesos de destilación convencionales. La extracción por arrastre de vapor permite preservar estos compuestos.
- Componentes farmacéuticos: En la industria farmacéutica, esta técnica se emplea para la extracción de componentes activos de plantas medicinales. Algunos medicamentos y extractos herbales utilizan esta técnica para obtener principios activos.
- Aceites vegetales: La extracción por arrastre de vapor también puede utilizarse para obtener aceites vegetales que se utilizan en la cocina o

para aplicaciones industriales. Ejemplos incluyen el aceite de coco, el aceite de oliva y el aceite de almendra.

- **Compuestos químicos:** En laboratorios y procesos industriales, esta técnica puede utilizarse para purificar compuestos químicos y separar mezclas de sustancias con diferentes volatilidades.

### **2.2.2. Aceites esenciales**

Los aceites se extraen de las hojas, pétalos, tallos, semillas e incluso de las raíces de las plantas. Las plantas aromáticas generalmente contienen aceite volátil en todas sus proporciones en diferentes concentraciones. La rosa, por ejemplo, secreta predominantemente aceite etérico a nivel de flores, mientras que el jengibre produce aceite más aromático en el rizoma. Cada aceite volátil es único, es diferente incluso dentro de la misma planta, y tiene aplicaciones muy variadas. La compleja combinación de sustancias orgánicas que forman un aceite volátil le da su nota específica, que depende de la especie, el período de cosecha, el clima, así como la parte de la planta de la que se extrae. Se han identificado numerosos compuestos que componen los aceites esenciales. Solo el aceite de menta tiene no más de 200 componentes diferentes. (13)

Muchos de los compuestos son isómeros estructurales. Entre estos principios activos de las plantas se encuentran sustancias como cineol, fenchone, limoneno, mentol, mentona, pineno, sabineno, algunos de los cuales están presentes en cantidades infinitesimales, lo que hace prácticamente imposible reproducir sintéticamente la composición de laboratorio de los aceites aromáticos de hierbas [14].

Estos aceites (figura 1) tienen muchas aplicaciones interesantes como aromas y fragancias en perfumería, cosmética, farmacéutica, alimentación, agricultura, industria, etc. Los aceites esenciales se pueden producir mediante diversas técnicas, que incluyen métodos convencionales, novedosos y biotecnológicos.

Los aceites esenciales están relativamente extendidos en el reino vegetal, siendo algunas familias muy ricas en tales sustancias, tanto en número como en cantidad. Normalmente, los aceites esenciales se encuentran en plantas superiores (alrededor de 50 familias) pertenecientes a órdenes de angiospermas (Asterales, Laurales, Magnoliales, Zingiberales, etc.) o ginsenósidos (Pinales), pero también conocidas como lactona sesquiterpénica, sesquiterpeno volátil, o algas que producen sesquiterpenos halogenados [15].

Aunque los compuestos terpénicos son característicos del reino vegetal, se han informado algunos monoterpenos biosintetizados a partir de bacterias del suelo, insectos (probablemente feromonas) y algunos sesquiterpenos y diterpenos de origen animal [16,17]

La síntesis y acumulación de aceites esenciales se produce ya sea fuera de la planta, en los cepillos glandulares (Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae, etc.) y en las papilas, ya sea dentro de la planta, en las células secretoras, en los espacios intercelulares (canales secretores), bolsas secretoras (Anacardiaceae, Rutaceae, Myrtaceae). Los aceites esenciales se pueden acumular en todos los órganos de las plantas, pero en cantidades variables. Así los podemos encontrar en: raíces, hojas, flores, frutos, madera de los tallos o en la corteza [13].

## Figura 1

### *Aceites esenciales*



Fuente: Ecología Verde (2019)

El contenido en aceites esenciales de plantas suele ser inferior al 1%, rara vez alcanza el 3% o poco más, en el producto seco de algunas plantas. El nombre de plantas aromáticas se atribuye a aquellas especies que contienen una mayor cantidad de aceite volátil (al menos 0,1-0,2%), que tienen un olor suficientemente perceptible o que se prestan a una explotación económicamente viable. Además, hay otras especies que, aunque tienen un olor característico, todavía contienen sustancias terapéuticas compuestas por aceites esenciales [13].

### **2.2.3. Composición química de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales son mezclas complejas (5000–7000 constituyentes químicos) en las que predominan los constituyentes mono y sesquiterpeno, pero también contienen compuestos aromáticos, a menudo derivados del fenilpropano, y rara vez se encuentran con diterpenos. Los compuestos terpénicos pueden ser hidrocarburos o derivados oxigenados (óxidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos) o sus productos de reacción (ésteres, éteres). Los

compuestos terpénicos son sustancias de origen vegetal que entran en la composición natural de mezclas moleculares que conducen a la formación de aceites volátiles (esenciales, etéricos). La obtención de aguas aromáticas y aceites esenciales requiere materias primas, productos vegetales, calidad. En primer lugar, la recolección del material vegetal debe realizarse con mucho cuidado, para que no se contamine con otras especies vegetales. Los aceites esenciales están muy extendidos en los órganos más variados de la planta, pero se encuentran más comúnmente en flores y hojas [18].

#### ***2.2.4. Mecanismo de extracción del aceite esencial***

En la operación batch, la alimentación se introduce por lotes al sistema. Es decir, se carga con un 'lote' y luego se lleva a cabo la destilación. Cuando se logra la tarea deseada, se introduce un siguiente lote de materia prima. Si se considera una mezcla binaria de componentes A (más volátil) y B (menos volátil). El sistema consiste en un lote de líquido (cantidad fija) dentro de un recipiente (puede ser una caldera o alambique) equipada con un elemento calefactor y un condensador para condensar el vapor producido. El vapor condensado se conoce como destilado [2].

El destilado se recoge en un receptor de condensado. El líquido que queda en el alambique se conoce como líquido residual. Los cambios de concentración se pueden analizar mediante el diagrama de fase y los cálculos matemáticos detallados se pueden realizar mediante la ecuación de Rayleigh [19].

Como se trata de un estado inestable, la derivación (en la ecuación) se basa en un enfoque diferencial de los cambios de concentración con el tiempo. Para la ecuación se tiene lo siguiente:

$L_1$  = moles iniciales de líquido originalmente en alambique

$L_2$  = moles finales de líquido que permanecieron en alambique

$x_1$  = composición líquida inicial en alambique (fracción molar de A)

$x_2$  = composición líquida final en alambique (fracción molar A).

En cualquier momento  $t$ , la cantidad de líquido en el alambique es  $L$ , siendo  $x$  la fracción molar de A en el líquido. Después de una pequeña diferencia de tiempo ( $t + dt$ ), se produce una pequeña cantidad de vapor  $dL$  y la composición de A en el vapor es  $y$  (fracción molar) [19].

Se supone que el vapor está en equilibrio con el líquido residual. La cantidad de líquido en el alambique se reduce así de  $L$  a  $(L - dL)$ , mientras que la composición líquida cambia de  $x$  a  $(x - dx)$ . Entonces, el balance de material en A se puede escribir como:

Cantidad inicial en el destilado = Cantidad que queda en el destilado + cantidad vaporizada

$$xL = (x - dx)(L - dL) + ydL$$

A partir de la ecuación anterior se tiene que:

$$Ldx = ydL - xdL$$

Reorganizando e integrando de  $L_1$  a  $L_2$ , y de  $x_1$  a  $x_2$ , se puede obtener el siguiente Ecuación que se llama Ecuación de Rayleigh:

$$\ln\left(\frac{L_1}{L_2}\right) = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{(y-x)} dx$$

La integración de la ecuación anterior se puede obtener gráficamente a partir de la curva de equilibrio, trazando  $1/(y-x)$  versus  $x$  [19].



## 2.3. Marco conceptual

### 2.3.1. *Espinaca*

La espinaca (*Spinacia oleracea*) (figura 2) es parte de las Chenopodiaceae (familia Goosefoot), que también incluye acelgas y remolachas. La espinaca se caracteriza por sus hojas carnosas de bajo crecimiento que forma una roseta pesada de hojas lisas o arrugadas [20].

#### Figura 2

*La espinaca*



Fuente: Wetmarket (2020)

El cultivo comenzó en Irán alrededor del año 400 d.C. Los árabes introdujeron la espinaca en España en el 1100 d. C. y se extendió al resto de Europa en el 1400 d. C. La primera variedad de hoja de col rizada se introdujo en América del Norte en 1828 [21].

La espinaca se comporta mejor en terrenos arenosos bien drenados o con alto contenido de materia orgánica (figura 3). Los cultivos tempranos y durante el invierno deben plantarse en suelos con buen drenaje y en suelos que se calientan temprano en la temporada. Los suelos de turba también se pueden

utilizar para la producción de espinacas. En todos los casos, el pH del suelo debe estar entre 6 y 6,8. La espinaca no es tolerante a los suelos muy ácidos, por lo que se recomienda analizar el suelo con regularidad [20,22].

### **Figura 3**

#### *Cultivos de espinaca*



Fuente: Wetmarket (2020)

Las variedades de espinaca se clasifican por tipos de hojas y hay tres tipos; saboya (arrugada), semisaboya y plana. La saboya y semisaboya se utilizan para los mercados frescos, mientras que los tipos lisos (planos) se utilizan para las espinacas baby [21].

La espinaca prefiere un clima fresco. La temperatura mínima para la germinación de la semilla es de 2 °C con una temperatura máxima de germinación de 30 °C y un rango óptimo de 7 a 20 °C. Las plantas jóvenes pueden soportar temperaturas tan bajas como -9 °C. El mejor crecimiento del cultivo ocurre entre

15 y 20 °C con una temperatura mínima de 5 °C y máxima de 30 °C. La espinaca crece rápidamente cuando los días son largos y calurosos [23].

### **2.3.2. Superficie de respuesta**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas cuyo propósito es analizar, mediante un modelo empírico. Los objetivos son los siguientes:

- Generar conocimiento en el dominio experimental de interés.
- Estimar de forma fiable la variabilidad experimental.
- Garantizar la adecuación entre el modelo propuesto y los datos experimentales (para facilitar la detección de la falta de ajuste).
- Para predecir la respuesta observada, de la manera más exacta y precisa posible, en puntos dentro del dominio experimental donde no

En cualquier caso, la MSR incluye mucho más que el ajuste de un modelo y su análisis. De hecho, es la base de la experimentación industrial. Últimamente ha renovado su interés en el marco de la calidad por diseño y la tecnología analítica de procesos, que son el núcleo de los nuevos procesos industriales, además de su control y aseguramiento de la calidad [27].

#### **Modelo empírico**

En general, se debería tener una función desconocida o muy compleja para modelar los datos de respuesta, pero puede aproximarse localmente mediante otra función polinomial más simple. El modelo de aproximación se basa en los datos experimentales y, como tal, es un modelo empírico cuya finalidad es representar adecuadamente la respuesta en el dominio experimental. Si esto se logra, el modelo empírico permitirá estimar con precisión la respuesta para

valores de las variables en las que no se realizaron experimentos. Por ejemplo, un modelo de superficie de respuesta de primer orden que podría describir la relación entre Y y  $X_j$  es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

Este es un modelo de regresión lineal múltiple con k variables independientes (predictoras). El modelo es lineal porque la ecuación anterior es una función lineal de los parámetros desconocidos. El coeficiente  $\beta_j$  representa el cambio esperado en la respuesta Y por cambio unitario en  $X_j$  cuando todas las variables independientes restantes se mantienen constantes. Si la curvatura en la superficie de respuesta real es lo suficientemente fuerte como para que el modelo de primer orden sea inadecuado, se requerirá un modelo de segundo orden [27].

#### **2.4. Definición de términos básicos**

- **Aceite esencial**

Líquido hidrofóbico concentrado que contiene compuestos químicos volátiles (que se evaporan fácilmente a temperaturas normales), provenientes de las plantas.

- **Rendimiento de extracción**

Cantidad de aceite esencial obtenida por cada kilogramo de materia prima utilizada.

- **Ácido fólico**

También conocido como folato, es la vitamina B que se encuentra en algunos alimentos. Adicionalmente se conoce como folacina y vitamina B9.

- **Vapor**

Es la materia cuando hierve, o se evapora, y que puede regresar al estado líquido solo con la disminución de la temperatura.

### III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

#### 3.1. Hipótesis (general y específicas)

##### Hipótesis general

El rendimiento del proceso de extracción de aceite esencial de espinaca sería superior a 0.2%, debido a la cantidad de ácidos grasos presentes.

##### Hipótesis específicas

El mayor rendimiento del aceite esencial se obtendrá cuando las hojas están en condición de humedad semiseca, y un tamaño menor a 2cm<sup>2</sup>.

El mayor rendimiento de aceite esencial se obtendrá con un tiempo de extracción mayor a 30min.

##### 3.1.1. Operacionalización de variables

En la tabla 1 se presenta la operacionalización de las variables de investigación.

**Tabla 1**

##### *Operacionalización de variables*

VARIABLE DEPEND.	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
Y = Rendimiento óptimo de la extracción de aceite de espinaca mediante el arrastre de vapor.	- Porcentaje de rendimiento	- Rendimiento %	- Optimización estadística
VARIABLES INDEPEND.	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
X <sub>1</sub> = Condiciones de la espinaca sometida al proceso de extracción.	- Tamaño de la hoja de espinaca - Humedad de las hojas de espinaca	- Hojas enteras - Hojas cortadas en cuadros de 1 cm <sup>2</sup> - Hojas cortadas en cuadros de 2 cm <sup>2</sup> - Hojas Húmedas, semisecas y secas.	- Pruebas de extracción por arrastre de vapor.
X <sub>2</sub> = Período de extracción de aceite esencial de espinaca.	- Tiempo de extracción	- 30, 60 y 90 min	- Pruebas de extracción por arrastre de vapor.

## IV. METODOLÓGÍA DEL PROYECTO

### 4.1. Diseño metodológico

Por su diseño interpretativo es experimental porque permitió manipular la variable independiente para determinar la variable dependiente.

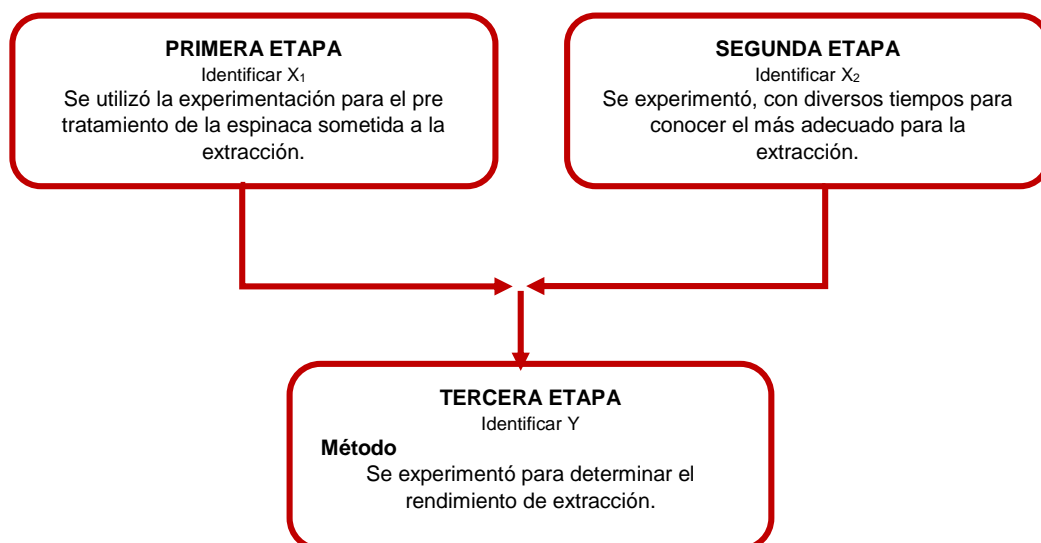
Por la naturaleza de los datos manejados es del tipo cuantitativo porque se basó en la medición de variables. También se puede afirmar que esta investigación es de tipo transversal porque el desarrollo del proyecto se llevó a cabo en un periodo específico y permitió desarrollar las variables en estudio, para su generalización.

La investigación se encuentra en el área de Ingeniería y Tecnología, en la línea de Ingeniería de Procesos.

Para la elaboración de la tesis se plantearon tres etapas de investigación, en las cuales inicialmente se identificaron las dos variables específicas ( $X_1$ ,  $X_2$ ) y se modeló la variable principal ( $Y$ ). El esquema de las etapas de investigación se muestra en la figura 4.

**Figura 4**

*Diseño de la investigación*



En este trabajo se realizaron variaciones de los parámetros de operación en la extracción del aceite esencial de espinaca (temperatura, tiempo de operación y forma de materia prima), para estudiar su efecto sobre la calidad del aceite esencial.

Se utilizó un diseño experimental factorial completo en Minitab. Se tuvieron en consideración 3 factores (humedad de las hojas, corte de la hoja y tiempo de operación) con 3 niveles cada uno. Este diseño se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Diseño experimental para las pruebas de extracción por arrastre de vapor*

<b>Prueba</b>	<b>Humedad de la hoja (%)</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Tiempo (min)</b>
<b>1</b>	90	Entera	30
<b>2</b>	90	Entera	60
<b>3</b>	90	Entera	90
<b>4</b>	90	1 cm <sup>2</sup>	30
<b>5</b>	90	1 cm <sup>2</sup>	60
<b>6</b>	90	1 cm <sup>2</sup>	90
<b>7</b>	90	2 cm <sup>2</sup>	30
<b>8</b>	90	2 cm <sup>2</sup>	60
<b>9</b>	90	2 cm <sup>2</sup>	90
<b>10</b>	50	Entera	30
<b>11</b>	50	Entera	60
<b>12</b>	50	Entera	90
<b>13</b>	50	1 cm <sup>2</sup>	30
<b>14</b>	50	1 cm <sup>2</sup>	60
<b>15</b>	50	1 cm <sup>2</sup>	90
<b>16</b>	50	2 cm <sup>2</sup>	30
<b>17</b>	50	2 cm <sup>2</sup>	60
<b>18</b>	50	2 cm <sup>2</sup>	90
<b>19</b>	20	Entera	30
<b>20</b>	20	Entera	60
<b>21</b>	20	Entera	90
<b>22</b>	20	1 cm <sup>2</sup>	30
<b>23</b>	20	1 cm <sup>2</sup>	60
<b>24</b>	20	1 cm <sup>2</sup>	90
<b>25</b>	20	2 cm <sup>2</sup>	30
<b>26</b>	20	2 cm <sup>2</sup>	60
<b>27</b>	20	2 cm <sup>2</sup>	90



#### **4.2. Método de investigación**

La investigación es experimental, observacional y usa análisis comparativo, obtenido de fuentes secundarias.

#### **4.3. Población y muestra**

##### **Población**

La población está representada por el proceso de extracción de aceite esencial de espinaca mediante arrastre con vapor.

##### **Muestra**

El tamaño de la muestra utilizado en esta investigación estuvo dado en base a la capacidad del equipo de destilación por arrastre de vapor. El recipiente que contuvo la materia prima (balón de vidrio) fue de un litro de capacidad, por ello se utilizaron 500g de materia prima para cada prueba, pero para verificar la reproducibilidad del trabajo, cada una se hizo por triplicado. Por lo tanto, para cada condición de trabajo se utilizó 1.5 kg de espinaca. Según lo planteado en el diseño experimental, fueron 27 condiciones distintas de trabajo, obteniéndose un total de 40.5 kg de espinaca, pero eso considerando solamente hojas de espinaca. Como el expendio de este vegetal no se realiza por hojas, sino que incluye los tallos, se realizó una estimación con una relación hoja-tallo de 70:30, determinándose así el tamaño de muestra neto de 60 kg.

#### **4.4. Lugar de estudio y período desarrollado**

Las pruebas experimentales de extracción (de aceites esenciales) y los análisis químicos se realizaron en los laboratorios de la empresa Ages Ingenieros S.A.C, con el permiso respectivo.

#### 4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información

Inicialmente, se recibió la materia prima comprada en el “Mercado Mayorista La Parada”, proveniente de la región La Libertad (figura 5). Se lavaron las hojas y se secaron levemente con un paño seco. Luego, se separaron las hojas de los tallos (figura 6) y se clasificaron de acuerdo al tipo de procedimiento que debieron seguir.

##### Figura 5

*Recepción de la espinaca fresca*



##### Figura 6

*Hojas de espinaca lavadas y secas*



En base a lo planteado en el diseño experimental, la segunda variable a estudiarse era el tamaño de corte de las hojas. Se planteó trabajar con hojas enteras y también con cuadros de 1 y 2 cm<sup>2</sup> (medidos con un vernier). Ante esto, las dos terceras partes de las muestras recolectadas se cortaron en cuadros con los tamaños mencionados (figura 7).

### **Figura 7**

*Corte de las hojas de espinaca*



De acuerdo con la primera variable del diseño experimental, algunas muestras debían estar en condición de semisecas, y otras en condición de secas. Para lograr eso se requirió utilizar una estufa, que se utilizó a temperatura constante de 45°C por 3 horas para las que en adelante se consideran como semisecas, y 6 horas para las secas.

## Figura 8

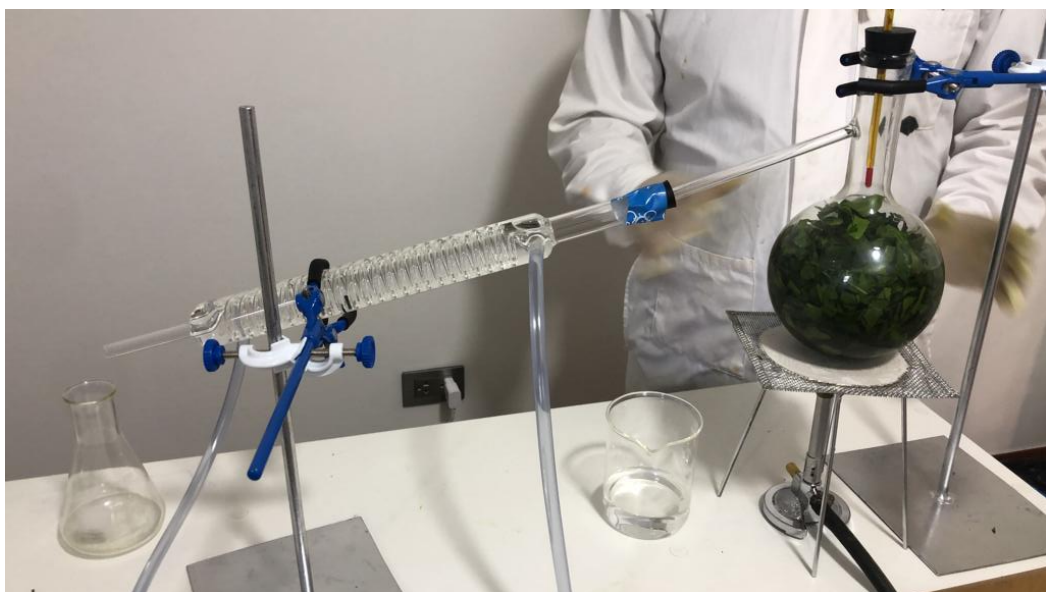
*Hojas semisecas de espinaca en cuadros*



Con la materia prima lista para pasar por las pruebas, se procedió a armar el equipo de extracción por arrastre con vapor. Contó de un balón de Pírex con doble salida (condensador – termómetro), con un tubo condensador, mechero de Bunsen y todo sostenido con soportes universales (figura 9).

## Figura 9

*Equipo de extracción por arrastre con vapor*



Como se aprecia también en la figura 11, la materia prima (500g) fue cargada en el balón de vidrio y se procedió a calentarlo, de acuerdo con cada una de las condiciones mencionadas anteriormente, en la tabla 3.

El extracto se recogió con un matraz Erlenmeyer de 500 mL que de inmediato se trasvasó a una pera de decantación para poder hacer la separación de la fase oleosa (aceite esencial) y de la fase acuosa. Se guardó inmediatamente la fase oleosa en frascos ámbar para evitar la degradación de algunos componentes orgánicos y de esta manera se almacenaron fuera del alcance de la luz solar y artificial, para poder someterlas posteriormente a los análisis químicos también planteados en la investigación. El rendimiento fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$\%Rendimiento = \frac{Masa_{aceite\ esencial\ (kg)}}{Masa_{materia\ prima\ (kg)}} \times 100\%$$

Para evaluar las características de los aceites esenciales obtenidos, se realizaron los análisis químicos y fisicoquímicos correspondientes. Las técnicas utilizadas se mencionan en el punto 4.5, y el análisis estadístico se menciona en el 4.6.

La base de esta investigación está sobre la observación y experimentación. Para ello hubo la necesidad de utilizar técnicas (ver Anexo A5) e instrumentos, que se enlistan a continuación.

### **Técnicas**

- Obtención de aceite esencial: destilación por arrastre de vapor
- Densidad: AOCS Cc 10c-95
- Acidez titulable: AOCS Cd 3d-63

- Índice de refracción: AOAC 921.08
- Contenido de ácido fólico: Determinación espectrofotométrica UV

### **Instrumentos y materiales**

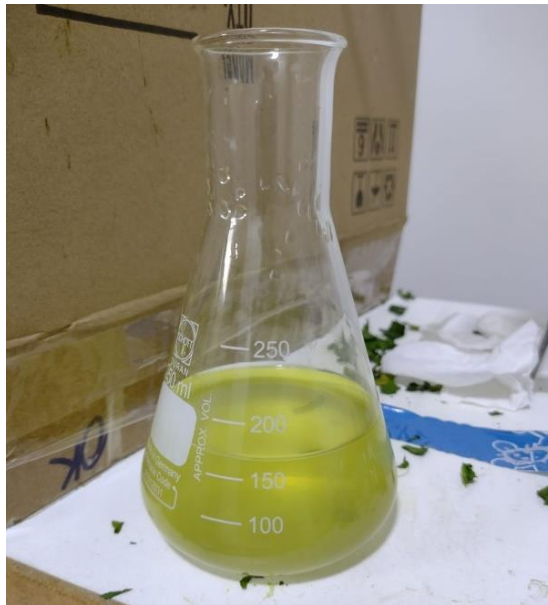
- Balón de vidrio de 1L.
- Tubo condensador
- Mangueras
- Soporte universal con nuez y aro
- Trípode
- Rejilla de asbesto
- Mechero de Bunsen
- Termómetro de laboratorio
- Balanza digital (hasta 5kg)
- Matraz Erlenmeyer 500 mL
- Vaso de precipitados de 500 mL
- Pera de decantación mL
- Frascos ámbar de 30 mL
- Picnómetro
- Balanza de laboratorio
- Agua desionizada
- Hidróxido de potasio 5M
- Bureta de 25 mL
- Refractómetro
- Espectrofotómetro UV

#### 4.6. Análisis y procesamiento de datos

En las pruebas de arrastre con vapor se obtuvieron los aceites esenciales de espinaca (figuras 10-12).

**Figura 10**

*Mezcla obtenida (fase acuosa y oleosa)*



**Figura 11**

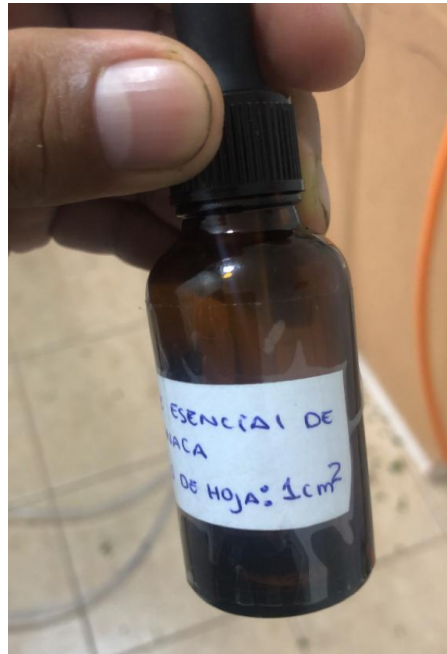
*Separación en la pera de decantación*





## Figura 12

### *Muestras de aceite esencial de espinaca*



Los datos obtenidos, tanto de rendimiento se analizaron mediante gráficos comparativos realizados en Excel. Además, las condiciones de operación se optimizaron utilizando el método de Superficie de Respuestas, mediante el software Minitab 21. Las variables de entrada fueron las condiciones de operación (humedad de la hoja, tamaño de corte y tiempo de operación) y las



variables de salida fueron el rendimiento de extracción, contenido de ácido fólico. En el siguiente capítulo se muestran los cuadros del análisis de varianza (ANOVA) de la optimización.

#### **4.7. Aspectos éticos en investigación**

La presente investigación se compromete a proteger los derechos de los autores de los distintos trabajos que sirven de sustento teórico de la investigación. Esto se basa en el CÓDIGO DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN – 2019, proporcionado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional del Callao.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Resultados descriptivos

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en las pruebas experimentales. En la tabla 3 se muestran los pesos de materia prima y aceite utilizados, así como el rendimiento de extracción.

**Tabla 3**

*Datos obtenidos en las pruebas experimentales y el rendimiento de extracción*

<b>Prueba</b>	<b>Promedio (kg)</b>	<b>Promedio (kg)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
1	0.4998	0.0012	0.24
2	0.5001	0.0011	0.21
3	0.4998	0.0013	0.26
4	0.5001	0.0015	0.29
5	0.5001	0.0018	0.35
6	0.5	0.0017	0.34
7	0.5001	0.0015	0.29
8	0.5	0.0015	0.3
9	0.5001	0.0017	0.33
10	0.4997	0.0011	0.22
11	0.5001	0.001	0.19
12	0.4998	0.0012	0.24
13	0.5	0.0013	0.26
14	0.5	0.0015	0.3
15	0.5003	0.0017	0.33
16	0.4997	0.0014	0.28
17	0.4999	0.0015	0.3
18	0.4998	0.0016	0.32
19	0.5002	0.0009	0.17
20	0.4999	0.0009	0.18
21	0.4998	0.0007	0.14
22	0.4997	0.001	0.2
23	0.5002	0.001	0.19
24	0.4999	0.0009	0.18
25	0.5002	0.0012	0.23
26	0.4996	0.001	0.2
27	0.4997	0.0009	0.18

En las tablas 4 y 5 se muestran los datos obtenidos en los análisis químicos y fisicoquímicos de las muestras de aceite esencial de espinaca obtenidas en las pruebas de destilación.

**Tabla 4**

*Datos de contenido de ácido fólico en las muestras de aceite esencial de espinaca*

<b>Prueba</b>	<b>Contenido de ácido fólico (ug/mL)</b>
1	1.18
2	1.23
3	1.21
4	1.17
5	1.23
6	1.22
7	1.26
8	1.21
9	1.23
10	1.17
11	1.21
12	1.25
13	1.23
14	1.21
15	1.24
16	1.26
17	1.22
18	1.19
19	1.18
20	1.21
21	1.17
22	1.22
23	1.24
24	1.18
25	1.19
26	1.21
27	1.22

**Tabla 5**

*Datos de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en las muestras de aceite esencial de espinaca*

<b>Prueba</b>	<b>Densidad (g/mL)</b>	<b>Índice de refracción</b>	<b>Acidez titulable (mgKOH/g)</b>
1	0.843	1.45	0.338
2	0.841	1.45	0.339
3	0.839	1.44	0.338
4	0.841	1.46	0.341
5	0.837	1.45	0.337
6	0.839	1.44	0.339
7	0.835	1.43	0.338
8	0.837	1.46	0.336
9	0.84	1.45	0.337
10	0.838	1.44	0.339
11	0.836	1.44	0.338
12	0.838	1.46	0.335
13	0.834	1.45	0.336
14	0.836	1.42	0.339
15	0.838	1.45	0.337
16	0.841	1.44	0.338
17	0.839	1.42	0.338
18	0.841	1.43	0.336
19	0.843	1.41	0.335
20	0.839	1.45	0.338
21	0.841	1.46	0.339
22	0.837	1.44	0.336
23	0.839	1.42	0.337
24	0.842	1.43	0.338
25	0.838	1.45	0.337
26	0.841	1.44	0.336
27	0.842	1.43	0.335

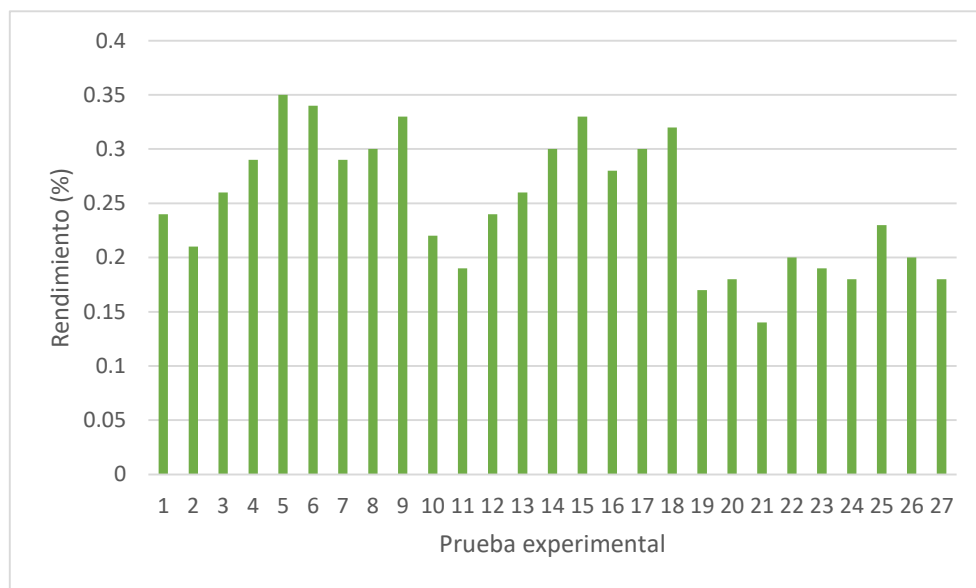
## 5.2. Resultados inferenciales

### 5.2.1. Rendimiento de extracción

En la figura 13 se muestran las fluctuaciones del rendimiento obtenido a lo largo de las 27 pruebas (triplicadas) de extracción.

**Figura 13**

*Rendimiento de las pruebas de extracción*



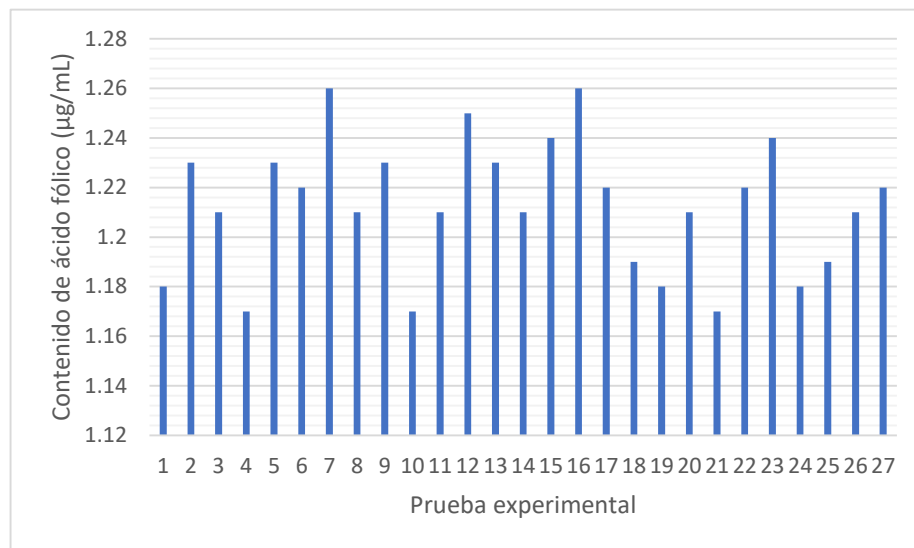
La figura permite conocer que el mejor rendimiento (0.35%) se encontró para las condiciones de la prueba 5. El gráfico permite inferir que los mejores rendimientos se encuentran entre las pruebas 1 y 18, que se dieron con la materia prima en condición de fresca y semiseca. Los rendimientos más bajos se dieron entre las pruebas 19 y 27, que fueron para hojas secas.

### 5.2.2. Pruebas químicas y fisicoquímicas

En las figuras 14, 15, 16 y 17 se muestran las fluctuaciones del contenido de ácido fólico, densidad, índice de refracción y acidez titulable.

**Figura 14**

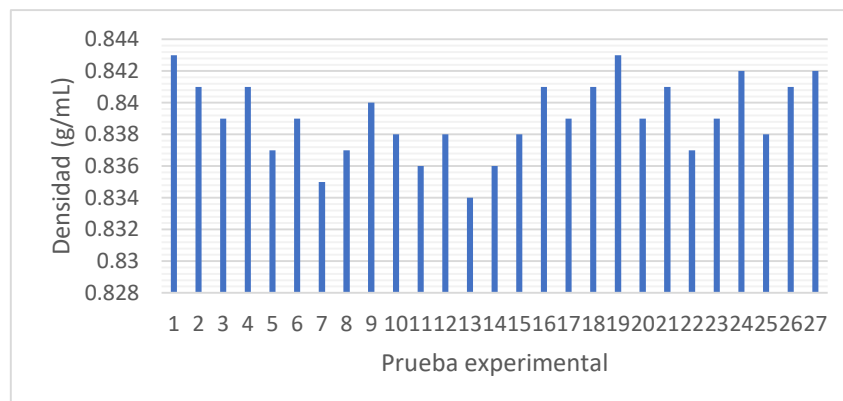
*Contenido de ácido fólico en las muestras de aceite esencial de espinaca*



La variación del contenido de ácido fólico se dio entre 1.17 y 1.26 µg/mL. El valor de este ítem para las muestras con mejor rendimiento fue de 1.23 µg/mL. Se determinó mediante esto que no hay una variación significativa en la cantidad de ácido fólico en cada una de las muestras, obtenidas a diferentes condiciones de operación. Algo similar ocurre con la densidad (0.834 – 0.843 g/mL), índice de refracción (1.41 – 1.46) y acidez titulable (0.335 – 0.341 mgKOH/g). Para la muestra con mejor rendimiento se obtuvo 0.837 g/mL, 1.45 y 0.337 mgKOH/g.

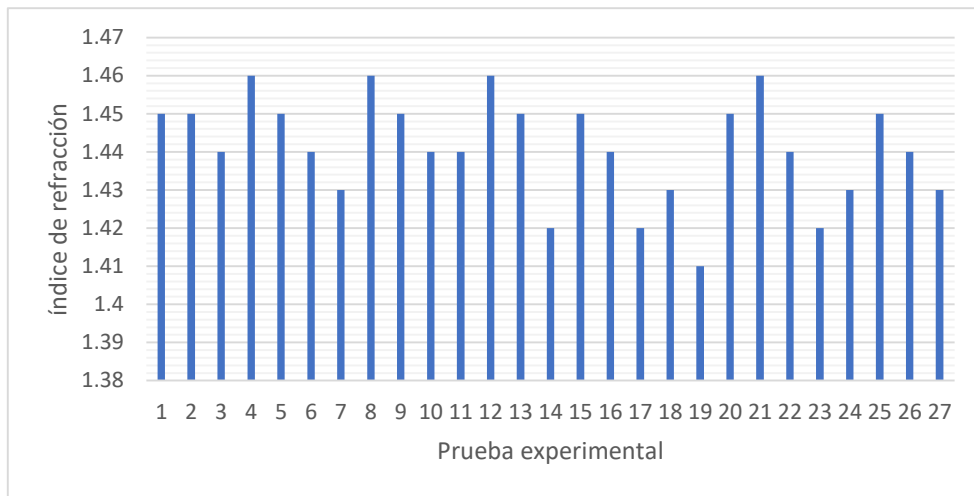
**Figura 15**

*Densidad de las muestras de aceite esencial de espinaca*



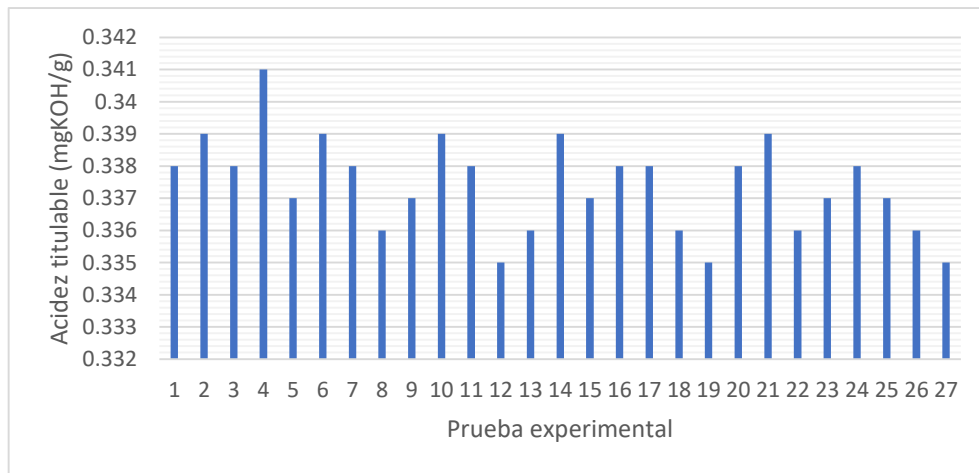
**Figura 16**

*Índice de refracción de las muestras de aceite esencial de espinaca*



**Figura 17**

*Acidez titulable de las muestras de aceite esencial de espinaca*



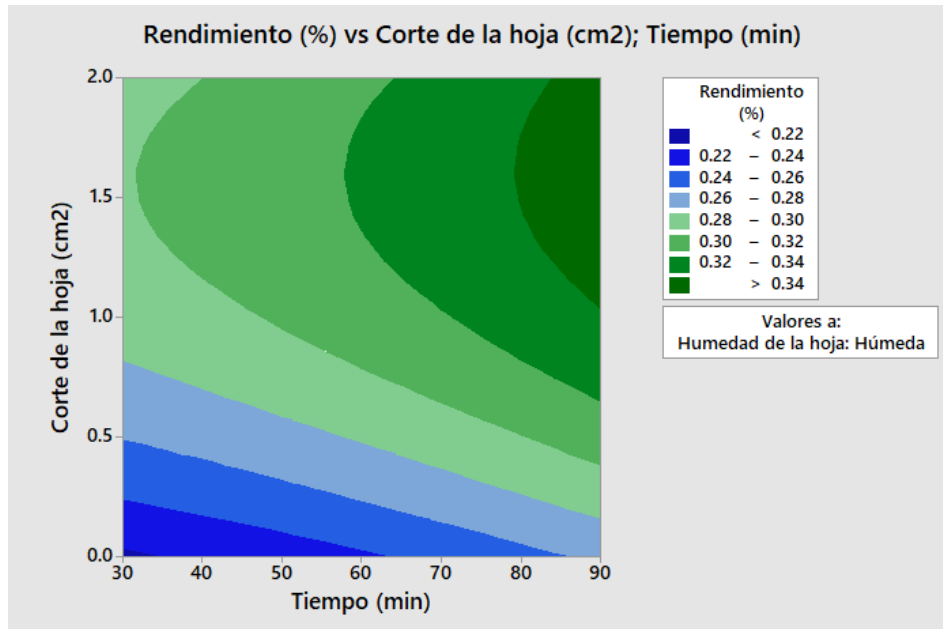
### 5.3. Otro tipo de resultados estadísticos

#### **Análisis estadístico de optimización de variables**

Se realizó la optimización estadística, utilizando el software Minitab 21. El análisis de varianza se muestra en el anexo A3. A continuación (figuras 18-23), se muestra las superficies de contorno construidas a partir de la optimización.

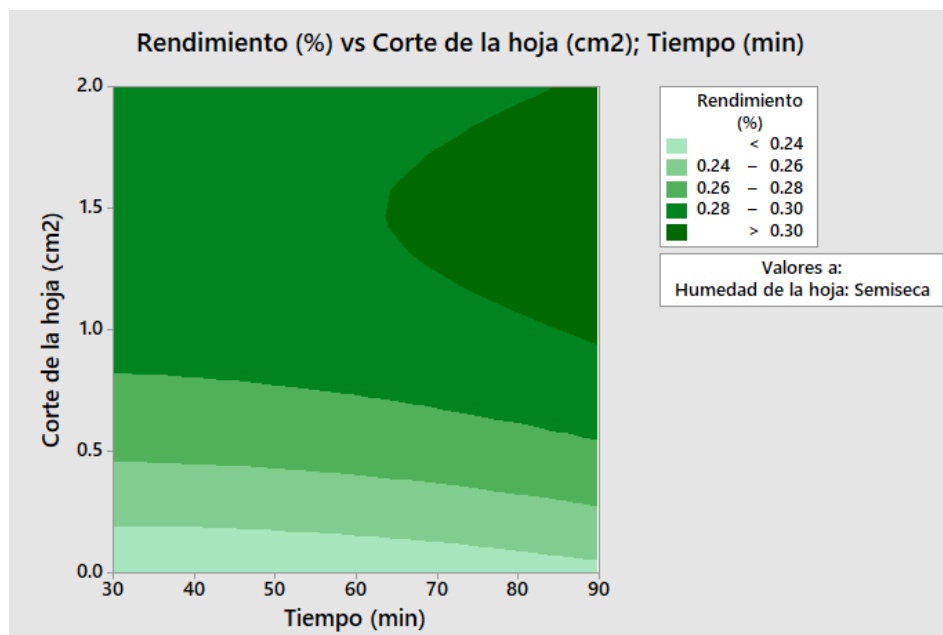
**Figura 18**

*Rendimiento vs corte de la hoja; tiempo – para hoja fresca*



**Figura 19**

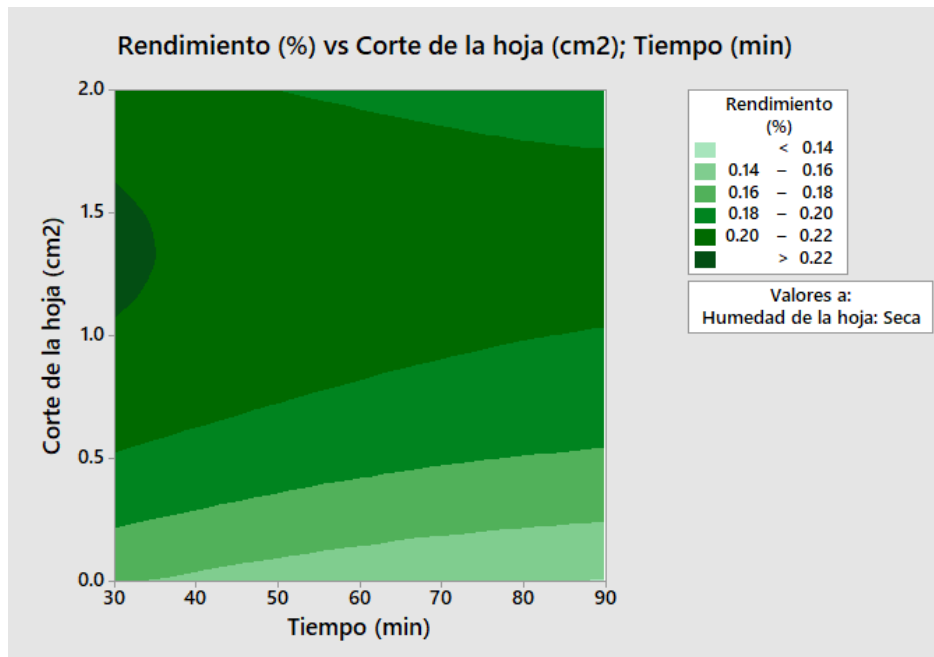
*Rendimiento vs corte de la hoja; tiempo – para hoja semiseca*





**Figura 20**

*Rendimiento vs corte de la hoja; tiempo – para hoja seca*



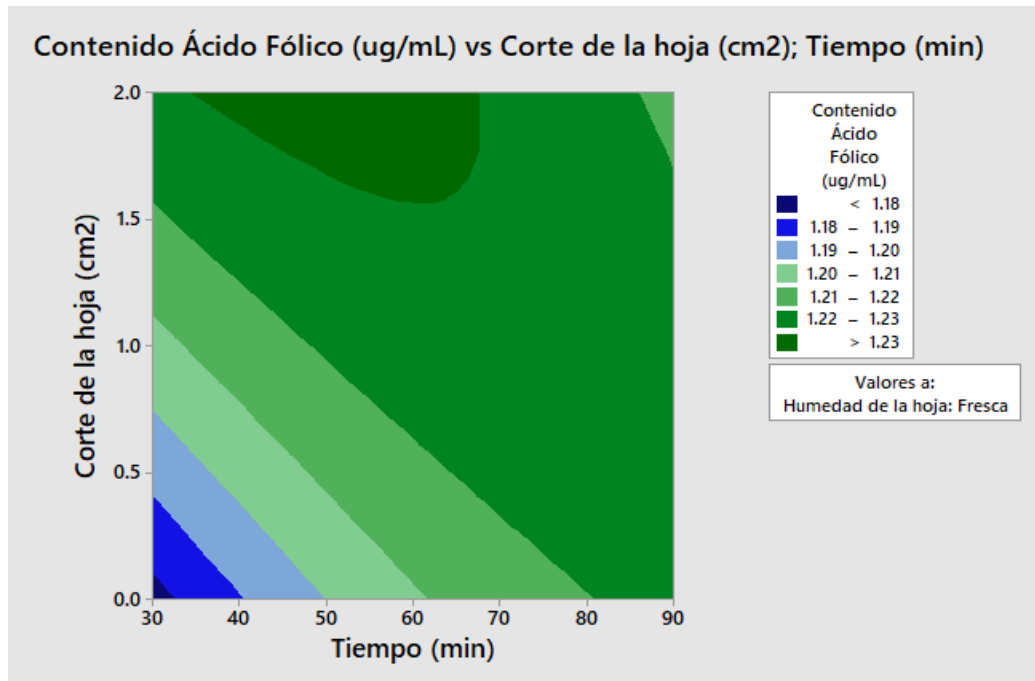
En las figuras 20, 21 y 22 se observan los gráficos de contornos, que permiten conocer las regiones con las condiciones más favorables en cuanto al rendimiento de la extracción (para hoja húmeda, semiseca y seca, respectivamente). Se observa que para hoja húmeda hay una pequeña región en la cual el rendimiento es mayor a 0.34%. Esto se da cuando el tamaño de corte está entre 1 y 2 cm<sup>2</sup>, con un tiempo de extracción entre 80 y 90 minutos.

Para el caso de las hojas semisecas la región con mejor rendimiento es bastante más grande, para las mismas condiciones de corte de hoja y con un tiempo de extracción entre 65 y 90 minutos.

Finalmente, para las hojas secas la zona de valor óptimo se reduce significativamente.

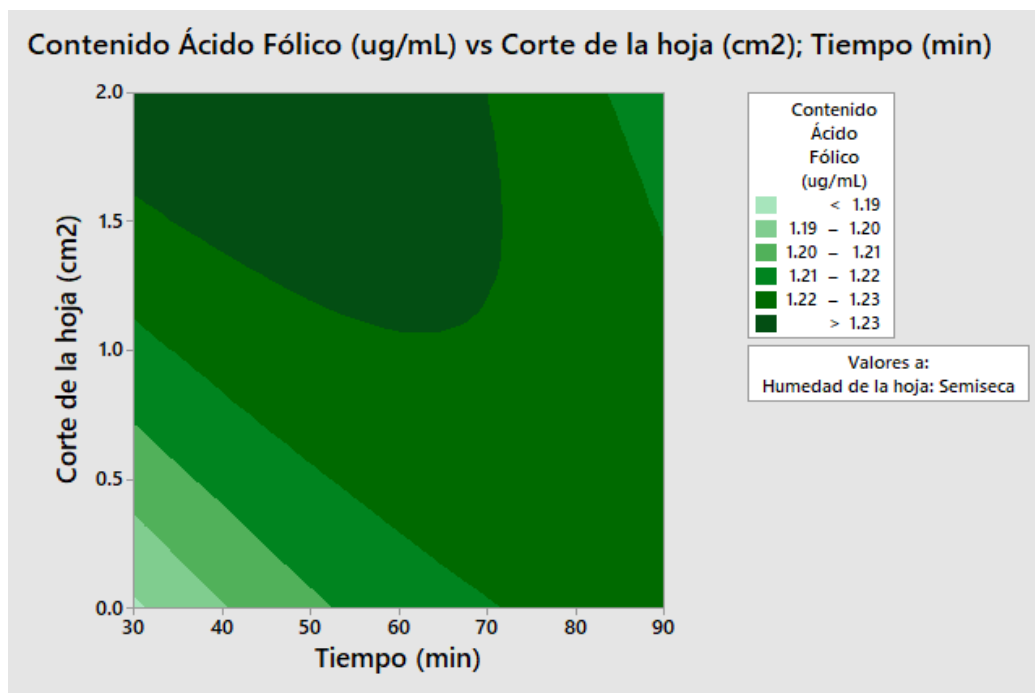
**Figura 21**

*Contenido de ácido fólico vs corte de la hoja; tiempo – para hoja fresca*



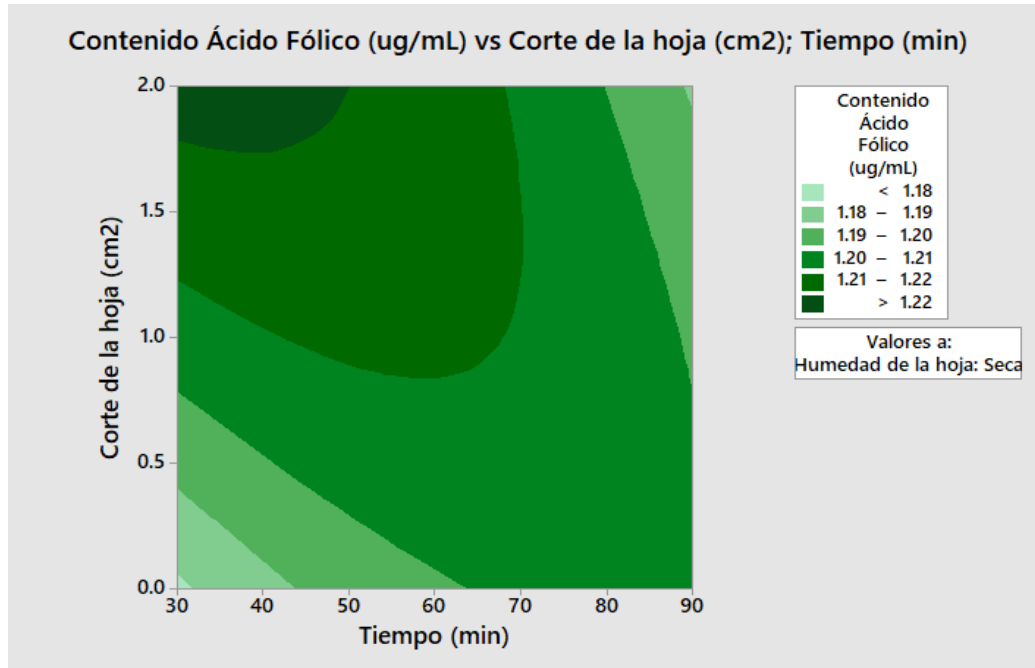
**Figura 22**

*Contenido de ácido fólico vs corte de la hoja; tiempo – para hoja semiseca*



**Figura 23**

*Contenido de ácido fólico vs corte de la hoja; tiempo – para hoja seca*



En las figuras 21, 22 y 23 la región de valor óptimo para el contenido de ácido fólico se bastante similar (hasta un tiempo cercano a los 70 minutos de extracción) y un tamaño de corte entre 1.5 y 2 cm<sup>2</sup>. Del mismo modo que con el rendimiento, la región de valor óptimo es mucho más limitada para hojas secas.

Los modelos construidos permitieron obtener su optimización, maximizando tanto el rendimiento, como el contenido de ácido fólico. El resultado se muestra en la figura 24.

**Figura 24**

*Optimización de las condiciones de operación*

Optimal		Corte de	Tiempo (
D: 0.7879	High	2.0	90.0
<a href="#">Predict</a>	Cur	[1.6364]	[68.1818]
	Low	0.0	30.0

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados

#### 6.1.1. *Contrastación de hipótesis general*

Durante las pruebas experimentales de extracción de aceites esenciales se obtuvo un rendimiento de extracción entre 0.2 y 0.35%; en base semiseca; este es un valor relativamente bajo debido a la cantidad de ácidos grasos presentes que tiene la espinaca; sin embargo, se ha logrado los objetivos planteados en la tesis. Por tanto, se acepta la hipótesis de la investigación.

#### 6.1.2. *Contrastación de hipótesis específicas*

De acuerdo con los resultados experimentales se observa que el mayor rendimiento en extracción de aceite esencial se obtiene cuando las hojas de espinaca están en condiciones de humedad semiseca, y un tamaño menor a 2 cm<sup>2</sup>; el proceso de optimización con el software Minitab corrobora el resultado experimental; específicamente indica una condición semiseca y un tamaño de corte de 1.63 cm<sup>2</sup>; por tanto, se acepta esta hipótesis específica.

Se planteó que se obtendría un mejor rendimiento cuando el tiempo de trabajo superase los 30 min. Esto se confirma mediante la optimización, que indica que las mejores condiciones se dan cercanas a los 70 minutos de extracción. Esto corrobora la hipótesis planteada y permite aceptarla.

### 6.2. Contrastación de resultados con otros estudios similares

En la investigación realizada sobre la extracción de aceite esencial a partir de hojas de orégano, determinaron que la extracción tuvo un mejor rendimiento

cuando las hojas se encontraron secas, con un valor cercano a 0.83%. Esto se explica sobre la base de que cuando el orégano se encuentra deshidratado, ha perdido el agua libre y los aceites esenciales han quedado concentrados en los intersticios de las pequeñas hojas, siendo más fácil de retirarse por el arrastre de vapor. [6]

Alvarez, en su investigación sobre la extracción de aceite esencial de salvia, utilizó diferentes tamaños de partícula (hoja entera,  $\frac{1}{2}$  hoja y  $\frac{1}{4}$  de hoja), y obtuvo mejores rendimientos cuando la hoja tenía el corte más pequeño y en condiciones de baja humedad. Este hecho tiene la misma explicación que se ha dado respecto al trabajo anterior. En el presente trabajo de investigación se tuvo un mejor rendimiento cuando el tamaño de partícula era aproximadamente de  $1.63 \text{ cm}^2$ ., algo análogo a lo mostrado en este antecedente. Esto confirma que existe una mejor difusión de materia cuando el tamaño de partícula es menor. [7]

En una investigación análoga, realizaron la extracción y caracterización de aceite esencial de romero. Obtuvieron un rendimiento de extracción de 0.64%, con 1.5 kg de materia prima. Este rendimiento superior al obtenido en esta investigación se debe a la naturaleza de la materia prima utilizada. [1]

En todos los casos mencionados, las condiciones de trabajo fueron similares.

### **6.3. Responsabilidad ética de acuerdo a los reglamentos vigentes**

El autor se responsabiliza por la información emitida en el presente trabajo de investigación, cumpliendo lo señalado en el CÓDIGO DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO, Resolución N° 210-2017-CU.7

## VII. CONCLUSIONES

- a. Se logró estimar el rendimiento de extracción del aceite esencial de espinaca (*Spinacia oleracea*), mediante la destilación por arrastre de vapor. Se determinó que, para las condiciones más favorables de operación, el rendimiento obtenido fue de 0.35% (valor acorde a lo señalado en la literatura).
- b. Se determinaron las condiciones de la espinaca sometida al proceso de extracción. Mediante la experimentación, el cálculo y la optimización estadística se determinó que la espinaca debe encontrarse cortada entre 1 y 2 cm<sup>2</sup> para obtener mejores rendimientos de extracción. El valor exacto proporcionado por Minitab fue de 1.63 cm<sup>2</sup> y para una condición de hoja semiseca.
- c. Se determinaron las condiciones de extracción favorables para la obtención de aceite esencial de espinaca. Las mejores condiciones de extracción del aceite esencial de espinaca se dan cuando el tiempo de extracción es cercano a los 70 minutos. Además, los análisis que se hicieron sobre el aceite esencial de espinaca revelaron que no hay un efecto significativo de las condiciones de operación sobre las propiedades del producto, ya que se observaron valores muy similares tanto para el contenido de ácido fólico, densidad, índice de refracción y acidez titulable.

## VIII. RECOMENDACIONES

- a. Se recomienda utilizar los tiempos mencionados para el secado de las hojas de espinaca que luego pasarán por la destilación por arrastre. Esto se hace porque se ha comprobado que es un factor diferencial al momento de hacer el cálculo del rendimiento.
- b. Finalmente, se recomienda tener un control estricto del tiempo de cosecha de la espinaca. Esto se menciona porque el tiempo y la radiación solar envejecen las hojas y podría ser esto el causante de no haber obtenido un rendimiento más alto.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Espinoza C, Cuya C. *Obtención y caracterización del aceite esencial de romero (Rosmarinus Officinalis) procedente del distrito de Mala-Lima.* Repos Inst – UNAC. 2017; 175.
- [2] Cedeño A, Moreira C, Muñoz J, Muñoz A, Pillasaguay S, Riera M. *EUCALIPTO (Comparison of distillation methods for obtaining eucalyptus essential oil ).* Rev Colón Ciencias, Tecnol y Negocios. 2019; 6(1):10.
- [3] Ruiz F. *Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (Mentha Spicata) mediante el proceso de destilación por arrastre a vapor.* 2017;1–62.
- [4] Henry Ricardo DAB-S, Guerrero-Intriago. *Extracción de aceites esenciales de mandarina (citrus reticulata) y palo santo (Bursera Graveolens) por el método de arrastre de vapor.* Rev Científica INGENIAR Ing Tecnol e Investig. 2019;2(3):14–23.
- [5] Housheya MAWJO. *Extraction, Characterization and Application of Essential oil from Native Palestinian Plants.* 2017;
- [6] Fabian J, Zambrano V. *Extracción De Aceite Esencial De Orégano Mediante Arrastre De Vapor.* 2017;59.
- [7] Alvarez Silguera JW, Ninahuana Jesus CA, Sanchez Reyes CA. *Extracción y caracterización del aceite esencial de salvia (Salvia Sagittata) mediante destilación con arrastre de vapor.* Repos Inst – UNAC [Internet]. 2018;78. Available from: <http://repositorio.unac.edu.pe/handle/UNAC/3535>



- [8] Bermudo G. *Extracción de aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus globulus) con el equipo modular de extracción de aceites esenciales*. 2019;
- [9] Quispe R. Programa De Maestría Maestría En Ciencias - Ingeniería Química. 2017; Available from: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/8345/Rene\\_Justo\\_Quispe\\_Flores.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/8345/Rene_Justo_Quispe_Flores.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [10] Chemat F, Boutekdjiret C. *Extraction // Steam Distillation* [Internet]. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier Inc.; 2015. 1–12 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11557-4>
- [11] Green JD. *Distillation*. *Encycl Anal Sci*. 2019;(September):214–9.
- [12] Grande JC, Rojas LH, Velasco S. *Destilacion Simple Y Fraccionada: Metodo De Purificacion De Liquidos*. *Esc Química Lab li Química Orgánica*. 2019;2–3.
- [13] Butnariu M, Sarac I. *Essential Oils from Plants*. *J Biotechnol Biomed Sci*. 2018;1(4):35–43.
- [14] Carhuallanqui A. *Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a Listeria monocytogenes y Staphylococcus aureus* *Antimicrobial effect of the essential oil of Oregano against Listeria monocytogenes and Staphylococcus aure*. *Rev Investig Altoandin* [Internet]. 2020;22(1):25–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- [15] Terreros J, Valqui V, Yauri R. *Extracción y caracterización del aceite*

*esencial de oregano (Origanum vulgare L.) de la hacienda Punchauca Lima. 2017;120.*

- [16] Gal R, Fern C. Autor: Jesús Ruiz Galán Tutora: Custodia Fernández Baco. 2019;
- [17] Boom EA, Orozco JA, Alean JD, Rojano B. *Evaluation of antioxidant activity of eucalyptus essential oils grown in Colombia.* Inf Tecnol. 2018;29(6):57–66.
- [18] León C, Jordán EP, Salazar K, Castellanos EX, Salazar FW. *Extraction system for the industrial use of essential oil of the subtle lemon (citrus aurantifolia).* J Phys Conf Ser. 2020;1432(1).
- [19] Subhabrata, Ray; Gargi D. *Distillation.* 2020. 281–350 p.
- [20] Perzabal-Ramos M, Sandoval-Castro E, Díaz-Ruíz R, Huerta-de la Peña A, Figueroa-Brito R, Bahena-Juárez F. *Respuesta de espinaca y de Spodoptera exigua a fertilización orgánica y mineral.* Rev Mex Ciencias Agrícolas. 2018;9(4):723–35.
- [21] Murcia MA, Jiménez-Monreal AM, Gonzalez J, Martínez-Tomé M. Spinach. Nutr Compos Antioxid Prop Fruits Veg. 2020;181–95.
- [22] Arevalo Cardenas E, Salas Carhuamaca II. *EFEECTO DE MICRONUTRIENTES EN EL DESARROLLO DE RADÍCULAS DE ESPINACA (Spinacea oleracea).* 2019;
- [23] Chitwood J. Spinach ( Spinacia oleracea L .) *Seed Germination and Whole Plant Growth Response to Heat Stress and Association Mapping of Bolting*

, *Tallness and Erectness for Use in Spinach Breeding* by. 2016;73.

- [24] Caparrotta S, Masi E, Atzori G, Diamanti I, Azzarello E, Mancuso S, et al. *Growing spinach (Spinacia oleracea) with different seawater concentrations: Effects on fresh, boiled and steamed leaves*. *Sci Horti* (Amsterdam). 2019;256(March 2021).
- [25] Tang G. Spinach and carrots: Vitamin A and health [Internet]. First Edit. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Elsevier Inc.; 2010. 381–392 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00025-6>
- [26] Jayo J. *Niveles de guano de isla y dosis de microorganismos eficaces en el rendimiento de espinaca (Spinacia oleracea L.)* Canaán, 2750 msnm - Ayacucho. Univ Nac San Martín [Internet]. 2018;52. Available from: <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/574>
- [27] Sarabia LA, Ortiz MC, Sánchez MS. *Response Surface Methodology* [Internet]. 2nd ed. *Comprehensive Chemometrics*. Elsevier Inc.; 2020. 287–326 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14756-0>

## ANEXOS

## A1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

### RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*) MEDIANTE ARRASTRE DE VAPOR

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLE DEPEND.	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuál será el rendimiento óptimo de extracción de aceite de espinaca mediante el arrastre por vapor?	Determinar el rendimiento óptimo de la extracción de aceite de espinaca mediante el arrastre por vapor.	El rendimiento del proceso de extracción de aceite esencial de espinaca sería superior al 0.2%, debido a la cantidad de ácidos grasos presentes.	Y = Rendimiento de la extracción de aceite de espinaca mediante el arrastre de vapor.	- Cantidad de aceite esencial.	- mL de aceite / kg de espinaca	- Experimental

PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES INDEPEND.	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿En qué condiciones deben estar las hojas de espinaca para someterlas al proceso de extracción de aceite esencial?	Determinar las condiciones de la espinaca sometida al proceso de extracción.	El mayor rendimiento del aceite esencial se obtendrá cuando las hojas están en condición de humedad semiseca, y un tamaño menor a 2cm.	X <sub>1</sub> = Condiciones de la espinaca sometida al proceso de extracción.	- Tamaño de la hoja de espinaca - Humedad de las hojas de espinaca	- Hojas enteras - Hojas cortadas en tiras de 1 cm - Hojas cortadas en tiras de 2 cm - Hojas Húmedas, semisecas y secas.	- Experimental
¿Cuáles son las condiciones de extracción para la obtención de aceite esencial de espinaca?	Determinar las condiciones de extracción favorables para la obtención de aceite esencial de espinaca.	El mayor rendimiento de aceite esencial se obtendrá con un flujo de vapor mayor a 5g/min y un tiempo de extracción mayor a 30min.	X <sub>2</sub> = Período de extracción de aceite esencial de espinaca.	- Tiempo de extracción	- 30, 60 y 90 min	- Experimental

## A2. TABLAS ADICIONALES

### Pesos de materia prima

Prueba	Peso de muestra (g)				
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio (g)	Promedio (kg)
<b>1</b>	499.8	499.6	500.1	499.8	0.4998
<b>2</b>	500.1	500.2	499.9	500.1	0.5001
<b>3</b>	499.8	499.7	499.9	499.8	0.4998
<b>4</b>	499.6	500.2	500.4	500.1	0.5001
<b>5</b>	499.8	500.5	500	500.1	0.5001
<b>6</b>	500.2	499.9	499.8	500	0.5
<b>7</b>	499.7	500.4	500.1	500.1	0.5001
<b>8</b>	499.9	500.2	499.8	500	0.5
<b>9</b>	500.4	500.3	499.6	500.1	0.5001
<b>10</b>	500	499.3	499.8	499.7	0.4997
<b>11</b>	500.1	499.7	500.5	500.1	0.5001
<b>12</b>	499.9	499.8	499.6	499.8	0.4998
<b>13</b>	499.8	499.8	500.4	500	0.5
<b>14</b>	500.2	499.8	499.9	500	0.5
<b>15</b>	500.3	500.1	500.4	500.3	0.5003
<b>16</b>	499.3	499.8	500	499.7	0.4997
<b>17</b>	500.2	499.8	499.8	499.9	0.4999
<b>18</b>	499.7	499.9	499.9	499.8	0.4998
<b>19</b>	499.9	500.4	500.4	500.2	0.5002
<b>20</b>	499.8	500	500	499.9	0.4999
<b>21</b>	500.2	499.3	499.8	499.8	0.4998
<b>22</b>	499.7	499.9	499.6	499.7	0.4997
<b>23</b>	499.9	500.4	500.2	500.2	0.5002
<b>24</b>	499.9	500	499.7	499.9	0.4999
<b>25</b>	500.4	500.3	499.9	500.2	0.5002
<b>26</b>	500	499.3	499.6	499.6	0.4996
<b>27</b>	499.6	499.7	499.8	499.7	0.4997

## Pesos del aceite esencial obtenido

Prueba	Peso de aceite obtenido (g)				
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio (g)	Promedio (kg)
1	1.2	1.3	1.2	1.2	0.0012
2	1	1.2	1	1.1	0.0011
3	1.3	1.2	1.4	1.3	0.0013
4	1.4	1.6	1.4	1.5	0.0015
5	1.8	1.6	1.9	1.8	0.0018
6	1.8	1.7	1.6	1.7	0.0017
7	1.4	1.4	1.7	1.5	0.0015
8	1.5	1.4	1.7	1.5	0.0015
9	1.6	1.7	1.8	1.7	0.0017
10	1.1	1.2	1.1	1.1	0.0011
11	0.9	1.1	0.9	1	0.001
12	1.2	1.1	1.3	1.2	0.0012
13	1.3	1.5	1.2	1.3	0.0013
14	1.7	1.5	1.4	1.5	0.0015
15	1.7	1.8	1.5	1.7	0.0017
16	1.4	1.4	1.5	1.4	0.0014
17	1.5	1.6	1.4	1.5	0.0015
18	1.7	1.4	1.6	1.6	0.0016
19	0.8	1.1	0.9	0.9	0.0009
20	0.8	1.1	0.8	0.9	0.0009
21	0.7	0.8	0.7	0.7	0.0007
22	0.9	1.2	0.9	1	0.001
23	1.1	1.2	0.8	1	0.001
24	0.8	1	0.8	0.9	0.0009
25	1.2	1.3	1.1	1.2	0.0012
26	1	1.1	0.8	1	0.001
27	0.9	1.1	0.8	0.9	0.0009

### A3. ANÁLISIS DE VARIANZA – OPTIMIZACIÓN

## SUPERFICIE DE RESPUESTA RENDIMIENTO VS HUMEDAD; CORTE DE LA HOJA; TIEMPO

#### Response Surface Regression: Rendimiento versus Humedad de la ; Corte de la ; Tiempo (min)

##### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	0.086650	0.009628	17.38	0.000
Linear	3	0.068867	0.022956	41.44	0.000
Humedad de la hoja	1	0.049089	0.049089	88.62	0.000
Corte de la hoja (cm2)	1	0.018689	0.018689	33.74	0.000
Tiempo (min)	1	0.001089	0.001089	1.97	0.179
Square	3	0.013400	0.004467	8.06	0.001
Humedad de la hoja*Humedad de la hoja	1	0.006667	0.006667	12.04	0.003
Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)	1	0.006667	0.006667	12.04	0.003
Tiempo (min)*Tiempo (min)	1	0.000067	0.000067	0.12	0.733
2-Way Interaction	3	0.004383	0.001461	2.64	0.083
Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)	1	0.000675	0.000675	1.22	0.285
Humedad de la hoja*Tiempo (min)	1	0.003675	0.003675	6.63	0.020
Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)	1	0.000033	0.000033	0.06	0.809
Error	17	0.009417	0.000554		
Total	26	0.096067			

##### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0235355	90.20%	85.01%	76.84%

##### Coded Coefficients

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant		0.2911	0.0120	24.29	0.000
Humedad de la hoja	-0.10444	-0.05222	0.00555	-9.41	0.000
Corte de la hoja (cm2)	0.06444	0.03222	0.00555	5.81	0.000
Tiempo (min)	0.01556	0.00778	0.00555	1.40	0.179
Humedad de la hoja*Humedad de la hoja	-0.06667	-0.03333	0.00961	-3.47	0.003
Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)	-0.06667	-0.03333	0.00961	-3.47	0.003
Tiempo (min)*Tiempo (min)	0.00667	0.00333	0.00961	0.35	0.733
Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)	-0.01500	-0.00750	0.00679	-1.10	0.285

Term	VIF
Constant	
Humedad de la hoja	1.00
Corte de la hoja (cm2)	1.00
Tiempo (min)	1.00
Humedad de la hoja*Humedad de la hoja	1.00
Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)	1.00
Tiempo (min)*Tiempo (min)	1.00
Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)	1.00
Humedad de la hoja*Tiempo (min)	1.00
Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)	1.00

##### Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned}
 \text{Rendimiento (\%)} = & 0.1128 + 0.1236 \text{ Humedad de la hoja} + 0.1106 \text{ Corte de la hoja (cm2)} \\
 & + 0.00093 \text{ Tiempo (min)} - 0.03333 \text{ Humedad de la hoja*Humedad de la hoja} \\
 & - 0.03333 \text{ Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)} \\
 & + 0.000004 \text{ Tiempo (min)*Tiempo (min)} \\
 & - 0.00750 \text{ Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)} \\
 & - 0.000583 \text{ Humedad de la hoja*Tiempo (min)} \\
 & + 0.000056 \text{ Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)}
 \end{aligned}$$



# SUPERFICIE DE RESPUESTA CONTENIDO DE ÁCIDO FÓLICO VS HUMEDAD; CORTE DE LA HOJA; TIEMPO

## Response Surface Regression: Contenido Ác versus Humedad de l; Corte de la ; Tiempo (min)

### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	0.006983	0.000776	1.14	0.387
Linear	3	0.002739	0.000913	1.35	0.293
Humedad de la hoja	1	0.000800	0.000800	1.18	0.293
Corte de la hoja (cm2)	1	0.001800	0.001800	2.65	0.122
Tiempo (min)	1	0.000139	0.000139	0.20	0.657
Square	3	0.001394	0.000465	0.69	0.573
Humedad de la hoja*Humedad de la hoja	1	0.000741	0.000741	1.09	0.311
Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)	1	0.000119	0.000119	0.17	0.681
Tiempo (min)*Tiempo (min)	1	0.000535	0.000535	0.79	0.387
2-Way Interaction	3	0.002850	0.000950	1.40	0.277
Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)	1	0.000033	0.000033	0.05	0.827
Humedad de la hoja*Tiempo (min)	1	0.000408	0.000408	0.60	0.449
Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)	1	0.002408	0.002408	3.55	0.077
Error	17	0.011535	0.000679		
Total	26	0.018519			

### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0260488	37.71%	4.73%	0.00%

### Coded Coefficients

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant		1.2293	0.0133	92.68	0.000
Humedad de la hoja	-0.01333	-0.00667	0.00614	-1.09	0.293
Corte de la hoja (cm2)	0.02000	0.01000	0.00614	1.63	0.122
Tiempo (min)	0.00556	0.00278	0.00614	0.45	0.657
Humedad de la hoja*Humedad de la hoja	-0.0222	-0.0111	0.0106	-1.04	0.311
Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)	-0.0089	-0.0044	0.0106	-0.42	0.681
Tiempo (min)*Tiempo (min)	-0.0189	-0.0094	0.0106	-0.89	0.387
Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)	-0.00333	-0.00167	0.00752	-0.22	0.827
Humedad de la hoja*Tiempo (min)	-0.01167	-0.00583	0.00752	-0.78	0.449
Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)	-0.02833	-0.01417	0.00752	-1.88	0.077

Term	VIF
Constant	

Humedad de la hoja	1.00
Corte de la hoja (cm2)	1.00
Tiempo (min)	1.00
Humedad de la hoja*Humedad de la hoja	1.00
Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)	1.00
Tiempo (min)*Tiempo (min)	1.00
Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)	1.00
Humedad de la hoja*Tiempo (min)	1.00
Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)	1.00

### Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned}
 \text{Contenido Ácido Fólico (ug/mL)} = & 1.0854 + 0.0511 \text{ Humedad de la hoja} \\
 & + 0.0506 \text{ Corte de la hoja (cm2)} + 0.00221 \text{ Tiempo (min)} \\
 & - 0.0111 \text{ Humedad de la hoja*Humedad de la hoja} \\
 & - 0.0044 \text{ Corte de la hoja (cm2)*Corte de la hoja (cm2)} \\
 & - 0.000010 \text{ Tiempo (min)*Tiempo (min)} \\
 & - 0.00167 \text{ Humedad de la hoja*Corte de la hoja (cm2)} \\
 & - 0.000194 \text{ Humedad de la hoja*Tiempo (min)} \\
 & - 0.000472 \text{ Corte de la hoja (cm2)*Tiempo (min)}
 \end{aligned}$$

#### A4. IMÁGENES ADICIONALES







## **A5. MÉTODOS UTILIZADOS**

# A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests

Cite this: *Anal. Methods*, 2014, 6, 3065

R. Matias,<sup>a</sup> P. R. S. Ribeiro,<sup>ac</sup> M. C. Sarraguça<sup>a</sup> and J. A. Lopes<sup>\*ab</sup>

Folic acid (FA) or pteroyl-L-glutamic acid, chemically known as *N*-[4-[[[(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridiny)methyl]amino]benzoyl]-L-glutamic acid, is a water-soluble B vitamin that helps build healthy cells. In this study, a new, simple, easy, accurate, precise, economic and sensitive UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in commercial tablets and during dissolution tests is presented. Using a phosphate buffer solution at pH 9.0 it was possible to determine the concentration of folic acid in commercial tablets at a  $\lambda_{\text{max}}$  of 282.5 nm in a linear range of 1.0–17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with a  $R^2 > 0.9999$  and recovery between 100.6 and 101.1%. The method was also optimized for the quantification of folic acid in dissolution tests in the same linear concentration range. The pH effect on the UV spectra of folic acid solutions was eliminated with a first derivative. This procedure allowed the direct measurement of samples from the dissolution vessel (pH approximately equal to 6) without any pH correction. This method was based on the first derivative of the absorbance at  $\lambda = 377.2$  nm, yielding an  $R^2 > 0.9997$  with recovery percentages similar to those presented before. The statistical comparison between the proposed and the HPLC reference method showed excellent agreement and indicates no statistically significant difference in accuracy and precision at a 0.05 significance level.

Received 24th October 2013  
Accepted 22nd February 2014

DOI: 10.1039/c3ay41874j

www.rsc.org/methods

## Introduction

Folic acid or pteroyl-L-glutamic acid, chemically known as *N*-[4-[[[(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridiny)methyl]amino]benzoyl]-L-glutamic acid (Fig. 1) belongs to the vitamin B group and it is present in many foods as free folic acid but mainly conjugated with glutamic acid residues.<sup>1</sup> The human metabolism is unable to produce folic acid, so the simplest way to obtain it is from diet. However, most of the times the amount obtained by diet is not sufficient so it has to be taken through pharmaceutical drugs. Moreover, the folic acid obtained from pharmaceutical preparations is more bioavailable than the one obtained from diet, since most of it is lost in the cooking process. This vitamin has received considerable attention because of its role in the prevention of diseases. Its function is vital to the biochemical process of DNA synthesis and repair. Pre-conception consumption of folic acid plays a major role in the prevention of neural tube defects, primarily anencephaly and spina bifida.<sup>2,3</sup>

Along the years several methods have been developed for the quantification of folic acid in pharmaceutical formulations. Chemiluminescence using a flow injection technique<sup>4</sup> and with fluorescence detection<sup>5</sup> was used to quantify folic acid in tablets. Another flow injection method, multicommutation, with fluorimetric detection was used to quantify folic acid in tablets after irradiation of the samples with ultraviolet (UV) light.<sup>6</sup> Other methods such as, a sensor with electrocatalytic detection<sup>7</sup> and square wave voltammetry<sup>8</sup> were also used to quantify folic acid in pharmaceutical preparations.

Several different chromatographic methods have been developed and applied in the determination of folic acid in individual tablets or in multivitamin tablets such as microemulsion electrokinetic chromatography,<sup>2,9</sup> high performance thin layer chromatography (HPTLC)<sup>10</sup> and ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC).<sup>11</sup> In addition combined methods such as liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS-MS)<sup>12</sup> and high performance liquid chromatography (HPLC)/

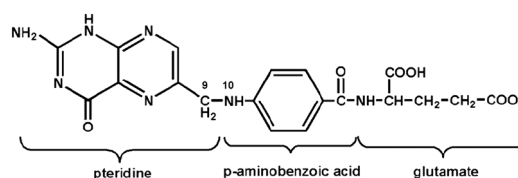


Fig. 1 Structural formula of folic acid.

<sup>a</sup>REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal

<sup>b</sup>Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal. E-mail: jlopes@ff.ul.pt

<sup>c</sup>NUPFARQ, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia (CCSST), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), CP: 65.900-410, Imperatriz, MA, Brazil



electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC/ESI-MS)<sup>13</sup> were also used to determine folic acid in multivitamin tablets.

The British pharmacopeia and the United States Pharmacopeia methods for the quantification of folic acid recommend the use of HPLC.<sup>14</sup> Even though HPLC is a sensitive and selective method and very well established in pharmaceutical applications, there are several disadvantages associated with it. HPLC has a complicated operation and maintenance system that requires large solvent volumes, with high cost of consumable supplies and the generation of substantial quantities of hazardous organic solvents, and consequently high disposable costs.<sup>2</sup> Also, the time required to perform HPLC is very high and not in accordance with the requirements of the quality control of a pharmaceutical industry that entails a more expeditious method.

Dissolution testing is an *in vitro* laboratory test method that is designed to demonstrate how efficiently an active drug substance is released by a solid oral dosage form<sup>15</sup> and has emerged as a very important tool in the generics pharmaceutical industry. It is widely used in formulation development, in monitoring the manufacturing process and as a quality control test.<sup>16</sup> A dissolution test is really a simple concept: a tablet or a capsule is placed into a known volume of media and as it dissolves the resulting solution is sampled over time and assayed for the level of active pharmaceutical ingredient (API) present. However, the design, development and validation of the procedure can be quite time-consuming, especially when one considers that not only the dissolution procedure must be developed and validated, but also any analytical technique used for the assay.<sup>17</sup>

This paper reports the development of a new, easy, accurate, precise, economic, sensitive and fast method using UV spectrophotometry for the quantification of folic acid in pharmaceutical formulations and dissolution tests. The proposed method was applied successfully to the analysis of the bulk drug, in tablets containing only folic acid as the active pharmaceutical ingredient and for the determination of the folic acid content during dissolution tests. For the quantification of folic acid in dissolution tests a first derivative UV spectrophotometric method was applied to eliminate the influence of pH. The method was validated by statistical comparison with the adopted reference method (HPLC) showing excellent agreement and indicating no significant difference in accuracy and precision at a 0.05 significance level.

## Experimental

### Instrumental methods

**High performance liquid chromatography.** A HPLC system (Merck Hitachi LC system, Ltd. Tokyo, Japan) comprising two LC L-7100 pumps, an interface D-7000 and a Diode Array Detector was used. Chromatography Data Station Software was used for chromatographic control and data processing.

A reversed-phase Spherisorb ODS2 column (pore size 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm, Waters, Dublin, Ireland) with a security guard cartridge (4.0  $\times$  3.0 mm, Phenomenex, USA) was used for separation. Each chromatographic run was performed under

isocratic elution (1.0 ml min<sup>-1</sup>) using a mobile phase consisting of buffer solution, pH 7.2 (mixture (1 : 1) of 0.6 mol l<sup>-1</sup> sodium perchlorate with 0.02 mol l<sup>-1</sup> potassium monobasic phosphate) and methanol (90 : 10) (v/v). The injection loop of 20  $\mu\text{l}$  was settled and the analysis was carried out at room temperature (20  $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$ ) with the detection wavelength fixed at 280 nm.

All solvents used in the chromatographic system were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter (HNWP, Millipore) using a vacuum pump (Büchi, Switzerland) and degassed for 15 min in an ultrasonic bath (JP Selecta, Barcelona, Spain).

**Ultraviolet spectrophotometry.** Ultraviolet measurements were made on a Jasco V-660 double beam UV-visible spectrophotometer (Jasco, USA) using 1 cm optical path quartz cells. The UV measurements were performed with a spectral resolution of 1 nm and a scan speed of 400 nm min<sup>-1</sup> considering the spectral range between 200 nm and 450 nm.

**pH measurements.** A Crison GLP22 pH-meter (Crison, Spain), calibrated with standard buffer solutions, was used for pH measurements.

**Dissolution tests.** The dissolution tests were performed using a rotating paddle apparatus with a temperature control, Erweka, model ZT3-1 dissolution test system (Erweka, Germany) with one vessel with a capacity of 1 l.

### Reagents and solutions

For the preparation of the solutions and samples, MilliQ ultra-pure water and grade glassware were used throughout the work. All chemicals and reagents were of analytical or HPLC grade.

The phosphate buffer used throughout the work was a 0.1 mol l<sup>-1</sup> solution of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Folic acid standard was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) with a purity of 89.9%.

A standard stock solution of folic acid (500.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) was prepared by dissolving of an equivalent to 50.0 mg of folic acid in 100.0 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> of phosphate buffer at pH 9.0. Working standard solutions were obtained by appropriate dilution of this stock solution with the phosphate buffer.

Commercial folic acid solid dosage forms of three different manufacturers were purchased from local stores and were tested prior to the listed expiration date. The three purchased commercial brands are designated brand A, F and G. All commercial samples were labeled to contain 5.0 mg of folic acid per tablet.

Excipients used in the interference studies were of pharmaceutical grade and were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

### Determination of folic acid in tablets

**UV spectrum of folic acid.** The UV spectrum of folic acid solutions is known to be severely affected by pH changes.<sup>18</sup> To analyse the pH effect, six folic acid solutions with different pH's were tested: 0.875 ml of a folic acid stock solution (500.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) was diluted to a volume of 25 ml with 0.10 mol l<sup>-1</sup> of phosphate buffer to obtain working standard solutions with a pH range between pH 7.0 and pH 9.5 with pH increments of 0.5 and a concentration of 17.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . These solutions were

measured on a UV spectrophotometer at a temperature of 25 °C (controlled room temperature). To analyse the absorbance maximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ), a volume of 0.875 ml of folic acid stock solution was diluted to a final volume of 25 ml with 0.10 mol l<sup>-1</sup> of phosphate buffer at pH 9.0 to obtain a folic acid reference solution of 17.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The buffer was the blank for all UV measurements.

**Linearity, range, stability and specificity.** To assess linearity, seven solutions with concentrations between 1.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (1.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 2.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 5.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 10.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 12.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 15.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 17.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were prepared using seven different aliquots of folic acid stock solution at pH 9. The solutions were measured by UV spectrophotometry using the buffer solution as blank. The absorbance was measured at 282.5 nm, and the respective values were used to determine the method's linearity by least squares. This procedure was carried out on three different days. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for the assay were also calculated.<sup>19</sup>

Effects of the most commonly used excipients were examined. The analysed excipients were magnesium stearate lactose, crospovidone and polyvinylpyrrolidone. Solutions containing folic acid with a concentration of 10.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and the excipients in the proportion 1 : 1 and 1 : 10, were stirred with 0.10 mol l<sup>-1</sup> of phosphate buffer at pH 9.0 in a magnetic stirrer for 20 minutes. Then, the solutions were filtered through a membrane filter with a filter pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ , diluted, and analysed by UV spectrophotometry.

To evaluate stability of folic acid solutions, a folic acid working solution with a concentration of 17.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  was prepared and preserved for 48 h at room temperature (25 °C) and analysed to test the folic acid stability in alkaline medium (pH 9).

**Folic acid assay of content.** The average tablet weight was calculated from 20 tablets and then finely powdered in a porcelain mortar. A portion of this powder, equivalent to 50.00 mg of folic acid was accurately weighed and dissolved in 80 ml of 0.10 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer at pH 9.0 and shaken for 20 minutes in a mechanical stirrer. The solution was filtered through a membrane filter with a filter pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  and transferred into 100.00 ml graduated flasks. The volume was made up to 100 ml with phosphate buffer at pH 9. Aliquots from this solution were transferred into 25.00 ml graduated flasks and were analysed by UV spectrophotometry. This procedure carried out made in triplicate for each tablet brand. The amount of folic acid per tablet was calculated from the calibration curve.

**Accuracy and recovery.** To confirm the accuracy of the proposed method and to check the interference of the excipients (matrix) present in commercial tablets, recovery experiments were carried out by the standard addition method. This study was performed by addition of known amounts (2.50, 5.00, and 7.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) of standard folic acid solution to a known concentration of the previously analysed commercial tablets. The resulting mixtures were analysed by UV spectrophotometry with the conditions already referenced. The drug recovery was calculated by comparing the concentration obtained from the spiked mixtures with that of the pure drug.

## Determination of folic acid in dissolution tests

To assess the possibility of quantifying folic acid in dissolution tests by UV spectrophotometry, dissolution tests with the three commercial brands already mentioned (brand A, brand F and brand G) were performed. The volume of the dissolution medium (500 ml of deionized water) was placed in the vessel and was controlled at 37  $\pm$  0.5 °C. One tablet was placed in the vessel and the dissolution vessel was immediately operated at 50 rpm for 15 minutes. Thirteen sampling points (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 and 15 minutes) were defined to monitor the dissolution. At each sampling time point, a 3.0 ml sample was collected using a syringe with a cannula, between the surface of the dissolution medium and the top of the rotating paddle. The mixture temperature was periodically verified and the vessel was kept covered over the entire duration of the dissolution test. Samples were filtered with a membrane filter with a pore dimension of 0.45  $\mu\text{m}$  prior to the analysis by HPLC and UV spectrophotometry.

## Results and discussion

Four broad absorption bands with absorption maxima at 217 nm, 257 nm, 282.5 nm and 361.5 nm can be observed in the spectra of folic acid solutions (Fig. 2). Most bands are dependent on the pH, and the band centered at 361.5 nm underwent a bathochromic shift moving between 346.5 nm at pH 7.0 and 363.5 nm at pH 9.0. Since in the literature it is referenced that folic acid is soluble and more stable in alkaline solutions the remaining experiments were carried out at pH 9.<sup>14</sup>

Folic acid solutions are known to degrade with light and temperature. To check the stability of the solutions a folic acid working solution with a concentration of 17.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  was used. The data given in Table 1 show the values of absorbance at 282.5 nm of this solution which remain unchanged after standing for 48 hours at room temperature (approximately at 25 °C) protected from light.

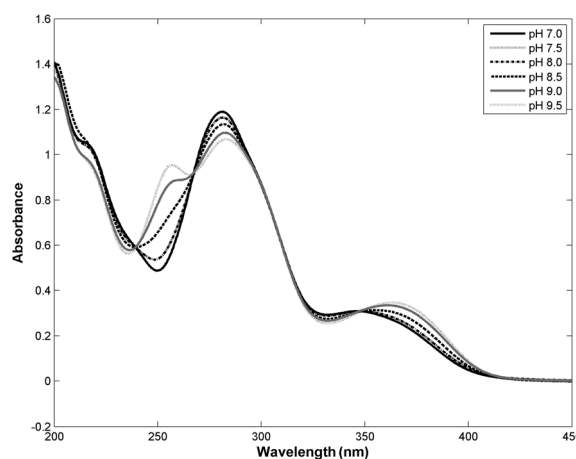


Fig. 2 Ultraviolet spectra of folic acid solutions at different pH values at a concentration of 17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (0.1 mol l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer).



**Table 1** Stability of a folic acid working solution with a concentration of 17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  at room temperature (25 °C)

Time (h)	Absorbance	%
0	1.08468	1.000
1	1.08509	1.000
2	1.08437	0.999
24	1.07699	0.992
48	1.07716	0.993

### UV method development

The UV spectra of folic acid show that the drug absorbed appreciably at 282.5 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ), so this wavelength was selected as the detection wavelength for determination of folic acid in pharmaceutical formulations. For the dissolution tests the concentration ranges from approximately 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in the first measuring point to around 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  by the end of the dissolution test. Therefore the range defined for linearity evaluation was between 1.00 and 17.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The calibration curve was obtained by least squares, and validated by evaluating the linear dynamic range, precision, limit of determination (LOD) and limit of quantification (LOQ). Under the described experimental conditions, Beer's law is obeyed in the concentration range from 1.00 to 17.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of folic acid with an excellent determination coefficient ( $R^2$ ) higher than 0.9999.

$$A_{282.5 \text{ nm}} = 0.00247 \pm 0.00037 + 0.06184 \pm 3.4860 \times 10^{-4} \times [\text{folic acid}] \quad (1)$$

In eqn (1)  $A_{282.5 \text{ nm}}$  is the value of the absorbance at 282.5 nm. The LOD ( $3.3 \cdot \text{SD}_{\text{blank}}/\text{slope of curve}$ ) and LOQ ( $10 \cdot \text{SD}_{\text{blank}}/\text{slope of curve}$ ) were  $9.3 \times 10^{-3} \mu\text{g ml}^{-1}$  and  $28.2 \times 10^{-3} \mu\text{g ml}^{-1}$  of folic acid, respectively.<sup>20</sup> The test for adequateness of the linearity model allows the validity of the regression model and the chosen working range to be verified. The ANOVA lack of fit model is based on the comparison of the tabulated  $F$  of Fisher values with the observed  $F$  of Fisher values calculated on the basis of the experimental results, and on the sums of squares. Thus, in this specific case the calculated value  $F_{\text{lack of fit}}$  ( $F_{\text{lack of fit}} = 0.23$ ) was less than the tabulated  $F$  values ( $F_{\text{Tab}}(5,14) = 2.96$ ) which indicates a linear response. The interference of the excipients was studied to estimate the specificity of the method to folic acid. According to AOAC, the maximum RSD value acceptable for the working level of the analyte (10.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) is 5.3%.<sup>21</sup>

The percentage of folic acid found in the test solutions ranged from 98.2 to 102.5%, with RSD values less than 1.1% for three replicates, indicating that no interferences of the excipients were observed under these conditions. In view of these results, the method was considered specific for folic acid.

### Determination of folic acid in tablets

The proposed UV method was then applied to the determination of folic acid in three tablet formulations (brand A, F and G). Results presented in Table 2, compare favourably with the reference method (HPLC) described in the USP, at a 95% confidence level using the  $t$ -student and Fisher test.<sup>22</sup> Both Student's  $t$  and  $F$  test showed that there is statistical equivalence between the two methods. These results testify the applicability of the proposed UV method for the determination of folic acid in pharmaceutical formulations.

A recovery study was carried out in order to investigate the presence of matrix effects and to check the accuracy and precision of the developed method. Three different concentrations of folic acid with concentrations of 2.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 5.00  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 7.50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  were spiked into a known concentration folic acid solution. The recovery test results are presented in Table 3. The recovery mean values for all samples are within the 100.6% and 101.1% range with relative standard deviations (RSDs) between 0.4% and 1.5%. These values ensure an accurate and precise method, without interference from any excipient present in the analysed tablets.

**Table 3** Recovery data from three different concentrations of folic acid spiked into a known concentration of folic acid tablet previously determined

Sample	Added ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Found ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recovery <sup>a</sup> (%)
A	2.50	2.55	102.0
	5.00	4.95	99.0
	7.50	7.55	100.7
			$\mu^a = 100.6 \pm 1.5$
F	2.50	2.52	100.8
	5.00	5.08	101.6
	7.50	7.57	100.9
			$\mu^a = 101.1 \pm 0.4$
G	2.50	2.54	101.6
	5.00	4.98	99.6
	7.50	7.60	101.3
			$\mu^a = 100.8 \pm 1.1$

<sup>a</sup> Average  $\pm$  relative standard deviation (RSD) of three determinations.

**Table 2** Determination of folic acid in commercial pharmaceutical formulations (tablets) by UV spectrophotometry and HPLC

Sample	Labelled value <sup>a</sup>	Proposed UV method				Official HPLC method	
		Found <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> (%)	$t$ -value <sup>d</sup> (2.78)	$F$ -value <sup>d</sup> (19.00)	Found <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> (%)
A	5.0	4.8 $\pm$ 0.04	0.8	2.12	4.00	4.9 $\pm$ 0.02	0.4
F	5.0	4.9 $\pm$ 0.15	1.2	0.90	1.56	4.8 $\pm$ 0.12	2.5
G	5.0	4.8 $\pm$ 0.09	0.4	0.33	1.78	4.8 $\pm$ 0.12	2.5

<sup>a</sup> Label to content for tablets: mg per unit. <sup>b</sup> Average value  $\pm$  standard deviation (SD) of three determinations. <sup>c</sup> Relative standard deviation (RSD) of three determinations. <sup>d</sup> The figures between parentheses are the theoretical values of  $t$  and  $F$ .

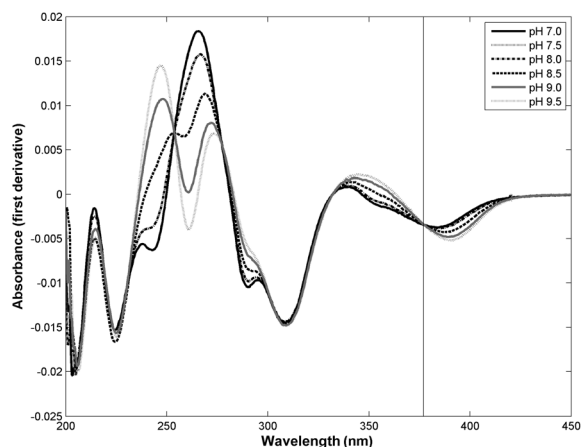


Fig. 3 First-derivative UV spectra of a  $17.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  folic acid solution at different pH values ( $0.1 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer).

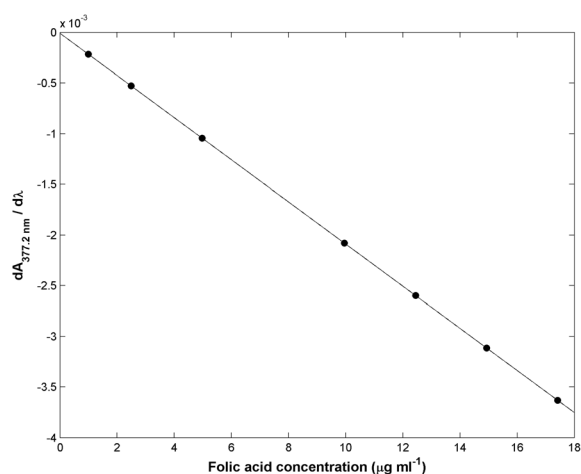


Fig. 4 First derivative UV calibration curve for the determination of folic acid during dissolution tests.

### Determination of folic acid in dissolution tests

The developed UV method for the determination of folic acid in pharmaceutical formulations described above cannot be applied for the quantification of folic acid in dissolution tests since the aliquots retrieved from the dissolution tests are at pH 6 (different from standards), because the pharmacopeia method recommends the use of water without buffer in the dissolution tests of folic acid. Therefore, to use the same folic acid standards, *i.e.*, folic acid in phosphate buffer at pH 9, to quantify folic acid directly from the dissolution samples, a different strategy is proposed. The method should therefore be insensitive regarding pH. To verify the existence of isosbestic points, specific wavelengths at which two chemical species have the same molar absorptivity, and the absorbance is essentially independent of the pH, a first derivative was applied to the UV spectra of a folic acid standard solution with a concentration of  $17.50 \mu\text{g ml}^{-1}$  at different pH's (from pH 7.0 to pH 9.5 with increments of 0.5 pH units). Three isosbestic points were found: 253.3 nm, 305.5 nm and 377.2 nm (Fig. 3). These wavelengths were tested to verify if the value of the first derivative of the absorbance was linear against the concentration of folic acid and if it was sensitive enough to perform the quantification. From the tested isosbestic points, the best linear correlation with the best sensitivity was found at 377.2 nm considering a folic acid concentration range between  $1.00 \mu\text{g ml}^{-1}$  and  $17.50 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The calibration curve at this wavelength is given by eqn (2) (see also Fig. 4).

$$dA_{377.2 \text{ nm}}/d\lambda = -9.21 \times 10^{-6} - 2.08 \times 10^{-4} [\text{folic acid}] \quad (2)$$

In eqn (2),  $dA_{377.2 \text{ nm}}/d\lambda$  is the value of the first derivative of the absorbance at 377.2 nm. Under the described experimental conditions, Beer's law is obeyed in the concentration range from 1.00 to  $17.50 \mu\text{g ml}^{-1}$  with a determination coefficient of

Table 4 Dissolution profiles of folic acid in commercial tablets

Time (min)	Dissolution											
	Sample A				Sample F				Sample G			
	UV derivative method		Official HPLC method		UV derivative method		Official HPLC method		UV derivative method		Official HPLC method	
	$\mu\text{g ml}^{-1}$	%	$\mu\text{g ml}^{-1}$	(%)	$\mu\text{g ml}^{-1}$	(%)	$\mu\text{g ml}^{-1}$	(%)	$\mu\text{g ml}^{-1}$	(%)	$\mu\text{g ml}^{-1}$	(%)
1	—	—	—	—	1.0	10.2	0.7	7.3	—	—	—	—
2	3.1	32.3	3.0	30.6	—	—	—	—	2.2	22.9	2.2	22.9
3	4.1	42.7	4.2	42.9	4.0	40.8	3.0	31.3	3.5	36.5	3.5	36.5
4	4.6	47.9	4.8	49.0	5.1	52.0	4.4	45.8	4.4	45.8	4.5	46.9
5	5.0	52.1	5.2	53.1	6.0	61.2	5.6	58.3	4.9	51.0	5.0	52.1
6	5.3	55.2	5.5	56.1	7.1	72.4	6.6	68.8	5.2	54.2	5.4	56.3
7	5.6	58.3	5.9	60.2	7.5	76.5	7.1	74.0	5.5	57.3	5.6	58.3
8	5.8	60.4	6.1	62.2	7.4	75.5	7.4	77.1	5.6	58.3	5.7	59.4
9	6.1	63.5	6.2	63.3	7.7	78.6	7.6	79.2	—	—	—	—
10	6.1	63.5	6.4	65.3	—	—	—	—	5.8	60.4	6.0	62.5
11	—	—	—	—	—	—	—	—	6.0	62.5	6.1	63.5
14	—	—	—	—	8.2	83.7	8.2	85.4	—	—	—	—
15	6.8	70.8	7.0	71.4	8.0	81.6	8.3	86.5	6.4	66.7	6.4	66.7

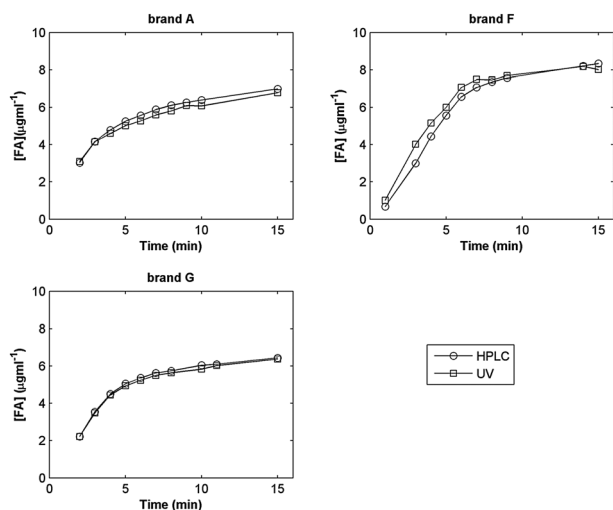


Fig. 5 Dissolution profiles of folic acid tablets of the three commercial brands, determined by HPLC and by the proposed first derivative UV method.

0.9997. Considering the first derivative value at 377.2 nm allowed the direct determination of folic acid solutions independent of the pH with calibration curves performed with standards at pH 9. This method allows the direct sampling of the dissolution testing vessel (pH around 6) without any further pH correction.

The three commercial brands already mentioned were subjected to dissolution tests. Aliquots of 3 ml retrieved at fixed intervals (see the Experimental section) were analysed by HPLC and UV spectrophotometry. Table 4 shows the concentration of folic acid determined by the reference method (HPLC) and by the optimized UV method. Note that concentrations presented in Table 4 are corrected for the decrease of volume resulting from the removal of 3.0 ml at each sampling point. Some dissolution points do not have results because some experimental problems occurred during the HPLC measurements and/or UV measurements. These points were considered outliers and were not used. The graphical comparison between the results obtained by both methods suggests an almost perfect matching between methods independent of the tested brand (Fig. 5). To perform a statistical comparison between the two methods, determination coefficient ( $R^2$ ) and regression analysis considering the 95% confidence level were performed (see Table 5). Linear regression data may be used for calibrating a new method against an established one or validating the

Table 5 Comparison between the HPLC and the proposed first derivative UV method for the determination of folic acid in dissolution tests

Sample	$R^2$	Slope		Intercept	
		Value	95% CI	Value	95% CI
A	0.995	0.912	0.860 to 0.965	0.278	-0.011 to 0.567
F	0.999	0.993	0.973 to 1.014	-0.130	-0.264 to 0.005
G	0.999	0.973	0.946 to 1.001	0.040	-0.100 to 0.181

utility of a method in relation to analytical quality specifications. The correlation coefficient indicates the magnitude of total random error of the method comparison, including nonlinearity, drift or shift, total analytical imprecision and sample-related effects.<sup>23</sup> The methods are considered statistically equal when the confidence interval for the slope includes the value 1 and the confidence interval for the intercept includes the value 0. For the three commercial samples both criteria were met with the exception of the slope for sample A. However, analysing the determination coefficients it can be seen that for the three cases values are always above 0.99 (the defined threshold).

## Conclusions

This work proposes an analytical method based on UV spectroscopy for the determination of folic acid in pharmaceutical formulations. The developed method, based on the absorbance at 282.5 nm is more simple and sensitive than most of the already reported spectrophotometric methods. Statistical parameters and data from recovery studies clearly validate the reproducibility and accuracy of the developed method. Analysis of commercial samples containing folic acid showed no interference from common additives and excipients in general.

For the determination of folic acid in dissolution tests a modification of the UV method was needed due to pH differences between standards and samples collected from a dissolution vessel. In this situation the first derivative of the absorbance spectrum at 377.2 nm was used instead.

For both situations the statistical comparison between the results of the adopted reference method (HPLC) and the proposed method, showed that the proposed method is suitable and robust for the quantification of folic acid in pharmaceutical formulations and in dissolution tests. These results along with the fact that it is a simple, fast and resource efficient method make it an important surrogate for HPLC, which is an expensive and time consuming technique.

The proposed UV method can be used to monitor dissolution tests with automatic sampling, since there is no need for processing the aliquot that is retrieved from the dissolution tests. With this method a step forward is made in the application of the Quality-by-Design concept defined by the ICH Q8(R2) guideline to dissolution tests.

## Acknowledgements

Mafalda Sarraguça acknowledges the grant SFRH/BPD/74788/2010. Paulo Roberto S. Ribeiro acknowledges FAPEMA (Foundation – Brazil). The authors acknowledge PEst-C/EQB/LA0006/2011 funded by QREN, POPH, FSE and Ministério da Educação e Ciência.

## Notes and references

- M. M. Araujo, E. Marchioni, A. L. C. H. Villavicencio, M. J. Zhao, P. Zimmermann, E. El-Khoury and M. Bargaentzle, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 7629–7633.

- 2 M. S. Aurora-Prado, C. A. Silva, M. E. Tavares and K. D. Altria, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1051**, 291–296.
- 3 V. De Brouwer, S. Storozhenko, J. C. Van de Steene, S. M. R. Wille, C. P. Stove, D. Van der Straeten and W. E. Lambert, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1215**, 125–132.
- 4 F. Nie, Y. H. He and J. R. Lu, *Microchem. J.*, 2000, **65**, 319–323.
- 5 P. Anastasopoulos, T. Mellos, M. Spinou, T. Tsiaka and M. Timotheou-Potamia, *Anal. Lett.*, 2007, **40**, 2203–2216.
- 6 R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos and E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **351**, 223–228.
- 7 H. R. Zare, M. R. Shishehbore and D. Nematollahi, *Electrochim. Acta*, 2011, **58**, 654–661.
- 8 S. Cakir, I. Atayman and O. Cakir, *Microchim. Acta*, 1997, **126**, 237–240.
- 9 M. S. Aurora-Prado, C. A. Silva, M. F. M. Tavares and K. D. Altria, *Chromatographia*, 2010, **72**, 687–694.
- 10 V. G. Dongre and V. A. Bagul, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, 2003, **16**, 112–116.
- 11 E. Deconinck, S. Crevits, P. Baten, P. Courselle and J. De Beer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, **54**, 995–1000.
- 12 B. C. Nelson, K. E. Sharpless and L. C. Sander, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1135**, 203–211.
- 13 Z. Chen, B. Chen and S. Z. Yao, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **569**, 169–175.
- 14 USP, Convention Inc., Rockville, MD, 2005, NF 23 Folic Acid Tablets, pp. 870–871.
- 15 FDA, 1997.
- 16 O. Anand, L. Yu, D. P. Conner and B. M. Davit, *The ASSPS*, 2011, **13**, 328–335.
- 17 B. Vaghela, R. Kayastha, N. Bhatt, N. Pathak and D. Rathod, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2011, **1**, 50–56.
- 18 S. Yakubu and J. Muazu, *Pharm. Sin.*, 2010, **1**, 55–58.
- 19 International Conference of Harmonization (ICH), *Q2-Validation of analytical procedures: text and methodology*, <http://private.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A>, January 2010.
- 20 G. L. Long and J. D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 712A–724A.
- 21 *AOAC Peer-Verified Methods, Policies and Procedures*, AOAC International, Arlington, 1993, p. 17.
- 22 J. N. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Limited, Harlow, England, 2010.
- 23 J. O. Westgard, *Clin. Chem.*, 2008, **54**, 612.

# Sustainable Waste-to-Energy Technologies: Transesterification

Shwe Sin Win and Thomas A. Trabold

*Golisano Institute for Sustainability, Rochester Institute of Technology, Rochester, NY, United States*

## 6.1 INTRODUCTION

As a result of rising demand for energy from various industries and broad global modernization, the price of crude oil is steadily increasing and driving volatility in cost of finished fuel products such as gasoline and diesel. Prices of crude oil are influenced by short-term impacts of world supply and demand for petroleum and other liquids, and production decisions by OPEC (DoE/EIA, 2014). Alternative fuels could provide a means to decrease reliance on fossil fuels, while minimizing net greenhouse gas (GHG) emissions from fuel combustion, thus improving air and water quality. Due to the growing demand from the renewable energy sector and high crude oil prices, global biodiesel production has increased by 23% per year on average between 2005 and 2015 (Naylor and Higgins, 2017). Biodiesel can be produced from vegetable and plants oils, or animal fats, and is an excellent alternative renewable energy source to nonrenewable petroleum-derived diesel fuel.

In August 2017, the Energy Information Administration (EIA) estimated that the United States produces 149 million gallons (564 million liters) of biodiesel produced from 1140 million pounds (517 million kg) of feedstock (EIA, 2017). The U.S. Department of Energy Clean Cities Alternative Fuel Price Report (2014) stated that the average B20 (i.e., 20% biodiesel, 80% petroleum diesel) price at market nationwide was \$3.81/gal, while the market price of B100 was \$4.21/gal, and diesel \$3.77/gal. Over the past 5 years, the cost of pure biodiesel (B100) has been approximately 1.2–1.5 times higher than petroleum diesel, depending on feedstock cost, plant size, and the value of by-product glycerol. Early adopters and environmentally minded consumers may be willing to pay a premium price for a renewable energy resource, but biodiesel production cost is high due to the generally low production volume of biodiesel relative to petroleum diesel. The National Renewable Energy Laboratory (NREL) reported that in 2018 there were 138 biodiesel plants across the United States, producing approximately 1 billion gallons of biodiesel per year (3.8 billion liters/year) from soybean, canola oil, corn oil, animal fats, yellow waste, and waste vegetable oils (NREL, 2018). This production volume is <2/3 of the total production capacity of nearly 2.5 billion gallons/year (9.5 billion liters/year).<sup>1</sup> About 40% of production plants use multiple feedstocks and diversifying feedstock portfolio will reduce price volatility and dependency on a single product (Lim and Teong, 2010; Chai et al., 2014). Soybean oil is still the largest biodiesel feedstock, with 608 million pounds (276 million kg) consumed,<sup>2</sup> and many biodiesel plants are located in close proximity to the centers of plant and animal feedstocks production in the Midwestern states (Fig. 6.1). However, waste cooking oil (WCO) and fats, oils, and grease (FOG) are common waste streams generated by many industrial, commercial and institutional food sector operations, and with appropriate pretreatment can also be suitable feedstocks for biodiesel production. These materials should be considered integral to the portfolio of resources available for sustainable food waste-to-energy conversion.

As an increase in global biodiesel production capacity has been observed, production of crude glycerol, a by-product of the transesterification reaction, is also expected to increase. However, the demand for crude glycerol has not kept pace, and because of its limited use, an oversupply of crude glycerol has had significant downward pressure on the market price. In 2008 crude glycerol from the rapidly growing biodiesel industry became the main player in the global glycerol market, which has driven some traditional glycerol production plants out of business (Gholami et al., 2014). As the value of crude glycerol has fallen to near zero, biodiesel producers are in many cases required to pay tipping fees to remove the material from their plants for disposal or incineration (Quispe et al., 2013). Efficient utilization of crude glycerol would potentially

---

1. <http://www.biodieselmagazine.com/plants/listplants/USA/>

2. <https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/>



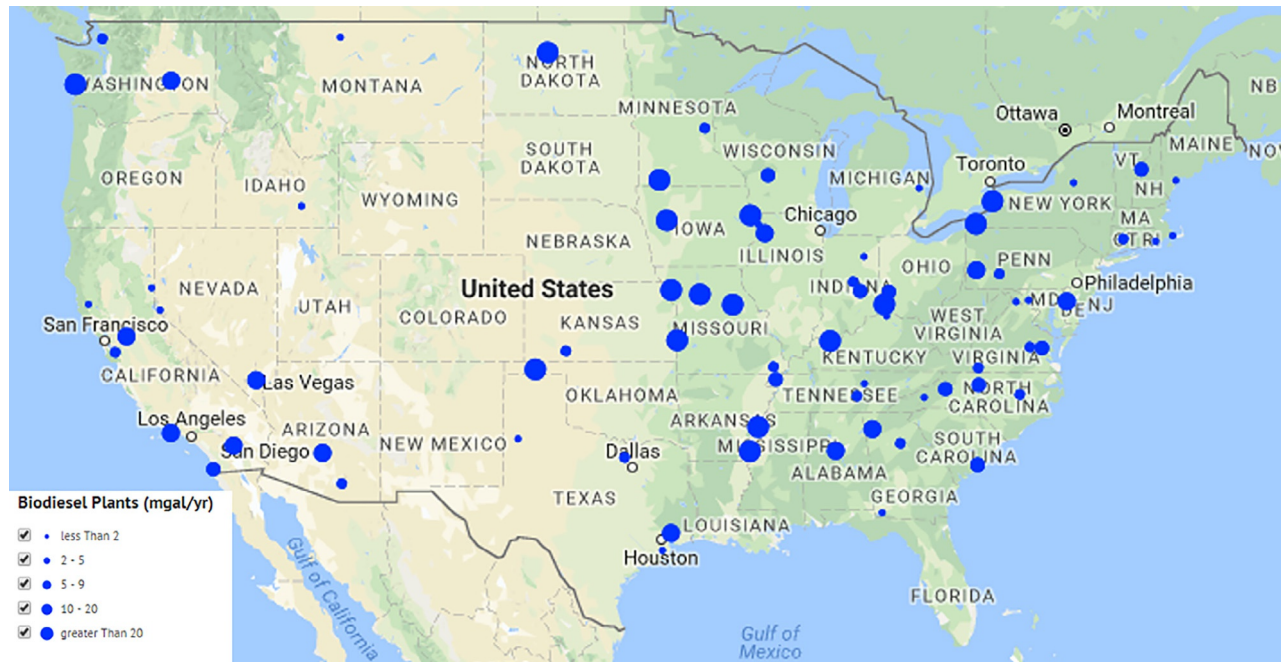


FIG. 6.1 Map of U.S. biodiesel plants. Size of dot indicates the volume of biodiesel produced (NREL, 2018).

help to lower the overall production cost of biodiesel, which is already high compared to diesel. But as the price of crude glycerol has fallen, the prices of alcohols and catalysts needed for purification and upcycling are generally unchanged (Mohammadshirazi et al., 2014). Crude glycerol from biodiesel production often contains a high level of contaminants, which further increases the purification cost. New applications for crude glycerol have been considered, and utilizing low-value crude glycerol in a community-based biodiesel production system is presented later in this chapter.

## 6.2 POTENTIAL FEEDSTOCKS FOR BIODIESEL PRODUCTION

It has been reported that >350 crops are available as feedstocks for biodiesel production (Atabani et al., 2013). Globally, 30% of biodiesel is produced from soybean oil, 25% from rapeseed oil, 18% from palm oil, 10% from recycled oils, 6% from animal fats, and 11% from other sources (Naylor and Higgins, 2017). In Europe, rapeseed oil is the primary source, while in the United States soybean oil accounts for 51% of total production on average, fluctuating between 40% and 60% of total feedstock used. Palm and coconut oils are widely used in Indonesia and Malaysia (Lim and Teong, 2010).

In many parts of the world, edible oils are considered essential to the daily diet as primary food resources. The demand for edible oils for biodiesel feedstock has been rising and that may create upward pressure on the price of the food commodity. The cost of raw material (vegetable oil or animal fat) is the primary factor driving the high biodiesel production cost, and biodiesel produced from virgin vegetable oil is often sold at a higher price than conventional petroleum diesel oil. Currently, the feedstock used for biodiesel production is primarily edible oils which account for 70%–95% of total production (Math et al., 2010).

The prospective feedstocks for biodiesel production can be categorized into three groups: edible, nonedible, and other sources, as summarized in Table 6.1. The cultivation of edible crops requires arable land which competes with food crops in agricultural land usage, and introduces associated environmental issues such as soil erosion, and pesticide leakage into the surface and groundwater (EEA, 2017). Nonedible biodiesel feedstocks such as jatropha, castor bean, and rubber seed do not directly compete for land needed for food production. Third-generation biofuels derived from alternative feedstocks such as algae seek to address the concerns associated with both edible and nonedible feedstocks. Algae have been considered as a viable feedstock to potentially replace soybean, rapeseed, and palm oils (Lim and Teong, 2010). However, despite high per acre productivity, fast growth rates, and ability to be grown on nonarable land areas, cultivation, harvesting, and valorization of algae biomass require high water use and high capital and operation cost, which make it economically challenging

**TABLE 6.1** Summary of Feedstocks for Biodiesel Production

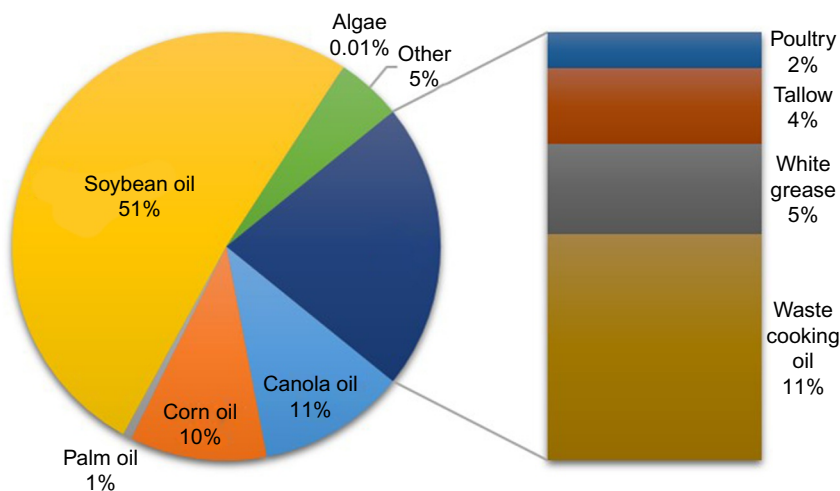
Edible feedstock (1st generation)	Canola, coconut, cottonseed, corn, soybean, sunflower, peanut, rapeseed, palm, mustard
Nonedible feedstock (2nd generation)	<i>Calophyllum inophyllum</i> L, castor bean, <i>Croton megalocarpus</i> L, <i>Jatropha curcas</i> L, <i>Moringa oleifera</i> L, karanja (pongamia oil), <i>Pongamia pinnata</i> , patchouli, <i>Sterculia foetida</i> L, rubber seed, sea mango, jojoba
Other sources (3rd generation)	Microalgae, spent coffee grounds (SCG), fats, oils and grease (FOG; including animal tallow, white grease, brown grease, yellow grease, fish oil), waste cooking oil (WCO)

Adapted and revised from [Gui et al. \(2008\)](#), [Atabani et al. \(2013\)](#), and [Verma and Sharma \(2016\)](#).

([Mussnug et al., 2010](#)). Nonetheless, utilization of algae for large-scale biodiesel production is under active research and development in many regions.

Approximately 8 million tons of coffee are produced per year and global coffee consumption is predicted to continue to increase ([Vardon et al., 2013](#)). A substantial quantity of spent coffee grounds (SCG) enters the global waste stream and in many regions is recognized as a major disposal challenge. Oil derived from spent coffee grounds (SCG) has been identified as a potential waste-based feedstock for biodiesel production due to its favorable oil content, which can be between 15 and 28 wt% depending on the coffee species, roasting and brewing processes, and extraction methods. One of the drawbacks to SCG as a biodiesel feedstock is that the sources can be widely dispersed, and transporting small quantities of SCG from multiple locations to a central biodiesel plant for further oil extraction is still a questionable economic proposition. Like other edible and nonedible feedstocks, oil from SCG can be extracted using n-hexane as a solvent which is only economically viable at relatively large production scale ([Tuntiwattanapun et al., 2017](#)).

The problem of high raw material cost can be addressed by using lower cost (or even “free”) feedstocks such as animal fat and waste vegetable oils. The production cost of biodiesel can be effectively reduced by 60%–70% by using waste cooking oil (WCO) instead of refined virgin oils ([Math et al., 2010](#)). Even when including the cost of pretreatment needed for refining relatively impure waste feedstocks, the overall production cost can still be reduced by 45% ([de Araújo et al., 2013](#)). The feedstock used for biodiesel production varies across countries depending on their geographical locations and agricultural practices ([Lim and Teong, 2010](#)), and the selection of raw material plays a significant role in effective biodiesel production depending on oil content, process chemistry, and economy of the process ([Karmakar et al., 2010](#)). For example, the composition of fatty acids in the raw feedstock influences the physiochemical properties of the final biodiesel product. [Fig. 6.2](#) shows the diverse sources of feedstocks used for biodiesel production in the United States. Free fatty acid (FFA) content, moisture content, and other impurities from oils can inhibit the transesterification reaction (described in [Section 6.3](#)) and affect the purity and quality of both biodiesel and crude glycerol coproducts. [Table 6.2](#) summarizes typical oil contents and estimated prices of select feedstocks for biodiesel production.

**FIG. 6.2** Production of biodiesel from different feedstocks in the United States ([Brosen, 2015](#)).

**TABLE 6.2** Estimated Oil Content and Average International Crude Vegetable Oil Price of Different Feedstocks and the Corresponding Biodiesel Price

Feedstock	Oil Concentration (%w/w)	Price of Crude Feedstock (US dollar/ton)	Price of B100 Biodiesel (US dollar/ton)	References
<i>Edible oils</i>				
Soybean	15–20	735	800–805	[1,2]
Rapeseed	38–46	815–829	940–965	[1,2]
Palm oil	45–55	610	720–750	[1,2]
<i>Nonedible oil</i>				
<i>Jatropha carcus</i>	Seed 35–40 Kernel 50–60		400–500	[2,3]
<i>Other sources</i>				
Microalgae ( <i>Botryococcus</i> sp.)	26.3	–	–	[4]
Microalgae ( <i>Chlorella</i> sp.)	10–48	–	–	[5]
Spent coffee ground	10–15	–	–	[6]
Animal tallow		245	500	[2]
Yellow grease	–	412	–	[7]
Waste cooking oil	–	224–360	600	[2,7]

[1] Baskar and Aiswarya (2016); [2] Lim and Teong (2010); [3] Gui et al. (2008); [4] Ashokkumar et al. (2014); [5] Islam et al. (2017); [6] Somnuk et al. (2017); [7] Demirbas (2009).

### 6.3 TRANSESTERIFICATION OF WASTE COOKING OIL (WCO)

Oils and Fats International has predicted that global total vegetable oil production in 2017/2018 will be 195 million tons (Lim, 2017). It is reasonable to expect that such large oil production levels will ultimately translate into availability of large volumes of WCO, also referred to as yellow grease, typically derived from edible oil that has been used for a certain period in a deep-frying process. Brown grease is often collected at grease traps in sink drains to prevent discharges of fats, oils, and grease (FOG) from entering and clogging sewer pipes. NREL has estimated that between 3 and 21 lbs (1.4 and 9.5 kg/person/year) of yellow grease from fast-food restaurants are produced in the metropolitan areas of the United States (Wiltsee, 1999). The average amount of grease discharged from each restaurant to sewage treatment plants ranged from 800 to 17,000 lbs/year (363 to 7718 kg/year). Similarly, Wiltsee (1999) reported total per capita production of 4.1 kg/year of yellow grease and 5.9 kg/year of brown grease (grease trap waste), and based on total US population this translates to an estimated 1.23 billion kg (358 million gallons) of waste oil and 1.81 billion kg (525 million gallons) of grease trap waste per year. It is therefore likely that a significant volume of used grease and oil resources is available for conversion to biodiesel fuel. A fraction of the material originating in the nonresidential sector is already repurposed for beneficial uses, but most of the rest is sent to wastewater treatment facilities and landfills. Some of the yellow grease resources are used for animal feed supplements, biodiesel production, and feedstock for anaerobic digestion system, but the bulk of WCO generated in the residential sector is discharged into the sewer systems where it can accumulate and cause blockages when left untreated (Wallace et al., 2017).

Waste cooking oil as a triglyceride supply from domestic and food service industries is the most economically viable feedstock because it is essentially “free” and potentially lowers the biodiesel production cost while also solving a serious waste disposal issue. However, the main disadvantages of waste cooking oil are the high free fatty acid (FFA), water and food residue content, depending on the cooking process and the storage type. Yellow grease (waste cooking oil) typically contains <15% FFA, while brown grease; fats, oils, and grease (FOGs) from grease traps or sewer systems often have >15% FFA. The content of FFA in the oil significantly increases during heating and frying processes over a long period. High FFA and water content and other impurities can present challenges to producing high-quality biodiesel (Wallace et al., 2017).



### 6.3.1 Basic Transesterification Process

Biodiesel production from vegetable oils and fats has been investigated for many years, and different production methods have been proposed to utilize triacylglycerol-containing materials (Knothe and Razon, 2017). Direct use and blending with petroleum-derived diesel fuel (petrodiesel), microemulsification, thermal cracking, and transesterification are the four basic production technologies. Among them, transesterification is the most economical technology, because of its low temperature and pressure conditions and relatively high yield. Biodiesel is chemically known as the mono-alkyl ester of fatty acids, or fatty acid (m)ethyl ester derived from triacylglycerol of vegetable/plant oils, and animal fats produced by transesterification (Knothe and Razon, 2017). During the transesterification process, also known as alcoholysis, triglycerides of fatty acids are reacted with alcohols in the presence of a catalyst to form monomethyl esters (biodiesel) and glycerol as coproducts, as shown in Fig. 6.3. The most commonly used low molecular weight, short-chain alcohols are methanol and ethanol, with methanol generally being less expensive with better reactivity.

Fundamentally, there are five main parameters that influence the biodiesel production process: free fatty acid (FFA) content of the feedstock, the type and amount of alcohol needed to support the reaction, type and amount of catalyst, molar ratio (alcohol:oil), and reaction time and temperature (Verma and Sharma, 2016). The stoichiometry of the reaction is 3:1 M ratio of alcohol to triglyceride in the oil; however, in practice the most recommended molar ratio is 6:1, in the temperature range of 50–60°C, with reaction time of 1 h with 1% w/w sodium hydroxide or potassium hydroxide since the reaction is reversible and excess methanol is required. <0.5 wt% of free fatty acid content is recommended with zero or low moisture content (Knothe and Razon, 2017). Type of feedstock, choice of catalyst, alcohol-to-oil ratio, reaction temperature, and time influence the transesterification and side reactions (Keera et al., 2011).

Transesterification processes can be categorized into catalytic and noncatalytic reactions. As expected, the presence of a catalyst should noticeably accelerate the reaction (Keera et al., 2011). Catalytic transesterification can be further divided into homogeneous acid and base catalytic reactions, heterogeneous acid and catalysts, and enzyme catalyst (organic in nature) to a lesser extent. The most common and simple noncatalyzed process uses supercritical methanol (MeOH), but it is still a very expensive process. The choice of catalyst for the transesterification reaction is mainly based on the free fatty acid (FFA) composition of the feedstock, and the type of catalyst influences the composition of the biodiesel product (Lam et al., 2010). All these methods have the ability to produce biodiesel from any triglyceride; however, they each have advantages and disadvantages, as summarized in Table 6.3.

### 6.3.2 Conversion of Institutional WCO

As described previously, heating conditions, FFA composition, and water content can significantly influence conversion of waste cooking oil to biodiesel. In general, waste cooking oils from restaurants and institutional food service operations such as cafeterias often contain large amount of free fatty acids and water. The free fatty acids can react with the alkaline catalyst to produce undesirable reaction by-products such as soap, and therefore the FFA value is expected to be <1 wt% prior to initiating the conversion process. A triglyceride contains a chain of three fatty acid molecules and one glyceride molecule. During the transesterification reaction, triglycerides (TG) are converted to diglycerides (DG) and then DG to monoglycerides (MG), and finally to glycerol. This three-stepwise reaction is reversible, and excess methanol is required to shift the equilibrium to the desired fatty product (Fig. 6.4).

When the raw WCO material contains a high percentage of free fatty acids and water, the water can hydrolyze with the triglyceride to produce diglycerides and form more long-chain free fatty acids while homogenous alkali catalyst (KOH) will react with the FFA to form soaps and water that reduces the ester yield. Strong acid catalysts like sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) are often first used for the esterification reaction to reduce the FFA content to less than approximately 1% (Fig. 6.5), followed

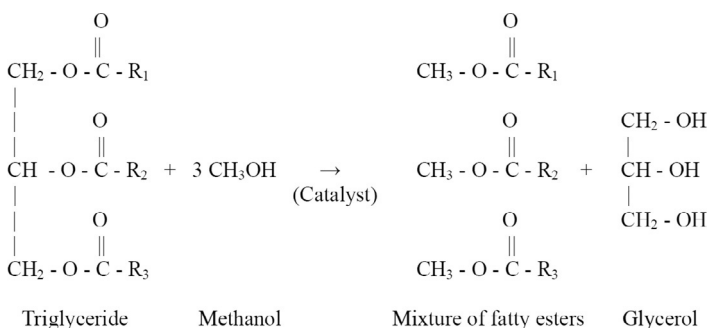


FIG. 6.3 General chemical equation for the overall transesterification reaction, where R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> are long-chain hydrocarbons (fatty acid chains) (Van Gerpen et al., 2004).

**TABLE 6.3 Various Transesterification Methods for Biodiesel Production From Waste Oils and Fats**

Chemical Process	Catalyst Materials	Advantages	Disadvantages
Homogeneous acid catalyst	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>• sulfonic acid</li> <li>• hydrochloric acid (HCL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• high conversion yield</li> <li>• relatively less sensitivity to FFA and water than base catalyst</li> <li>• low cost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• slow reaction rate</li> <li>• high reaction temperature and pressure</li> <li>• difficult to separate and recover glycerol</li> <li>• H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is corrosive and can lead to corrosion of equipment</li> </ul>
Homogeneous base catalyst	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOH</li> <li>• KOH</li> <li>• Sodium methoxide</li> <li>• Potassium methoxide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• high conversion rate</li> <li>• high catalytic efficiency</li> <li>• faster mass transfer rate</li> <li>• short retention time</li> <li>• low reaction temperature and pressure</li> <li>• low cost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• high sensitivity to FFA and water</li> <li>• highly energy intensive</li> <li>• difficult to recover glycerol</li> </ul>
Heterogeneous acid catalyst	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zirconium oxide (ZrO<sub>2</sub>)</li> <li>• Titanium oxide (TiO<sub>2</sub>)</li> <li>• Tin oxide (SnO<sub>2</sub>)</li> <li>• Zeolites</li> <li>• Sulfonic ion-exchange resin</li> <li>• Sulfonated carbon-based catalyst</li> <li>• Heteropolyacids (HPAs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• high conversion rate</li> <li>• insensitivity to FFA and water</li> <li>• catalyze esterification and transesterification simultaneously</li> <li>• easy to separate and reuse catalyst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• slow reaction time</li> <li>• high operation cost</li> <li>• energy intensive</li> <li>• high alcohol-to-oil molar ratio</li> </ul>
Heterogeneous base catalyst	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basic zeolites</li> <li>• Alkaline earth metal oxides</li> <li>• Hydrotalcites (Mg/Al)</li> <li>• Calcium oxide (CaO)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• less sensitivity to FFA and water content</li> <li>• high glycerol purity</li> <li>• easy to separate and reuse catalyst from the product</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• slow reaction time and high temperature</li> <li>• slow mass transfer rate</li> <li>• high alcohol-to-oil molar ratio</li> </ul>
Enzyme (biocatalyst)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Mucor miehei</i> (Lipozym IM60)</li> <li>• <i>Pseudomonas cepacia</i> (PS 30)</li> <li>• <i>Rhizopus oryzae</i></li> <li>• <i>Penicillium expansum</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• high conversion yield</li> <li>• insensitivity to FFA and water</li> <li>• low operating temperature (lower than homogenous base catalyst)</li> <li>• absence of by-product</li> <li>• easier purification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• long reaction time (slower than acid-catalyzed transesterification) and slower reaction rate</li> <li>• sensitivity to alcohol (methanol deactivates the enzyme)</li> <li>• high cost of lipase</li> <li>• technology is still under development</li> </ul>
Noncatalyzed (supercritical MeOH)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• high conversion yield</li> <li>• faster reaction rate and very short reaction time</li> <li>• absence of catalyst</li> <li>• eliminates FFA and water content issues</li> <li>• easy to separate by-products</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• high reaction temperature and pressure</li> <li>• requires large amount of MeOH</li> <li>• high cost of operation</li> <li>• high alcohol-to-oil molar ratio</li> <li>• technology is still under development</li> </ul>

Adapted and revised from Lam et al. (2010), Leung et al. (2010), Gui et al. (2008), Tsoutsos et al. (2016), Gnanaprakasam et al. (2013), and Yaakob et al. (2013).

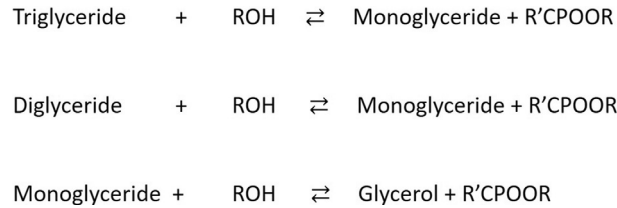


FIG. 6.4 Three stepwise transesterification reactions (Enweremadu and Mbarawa, 2009).

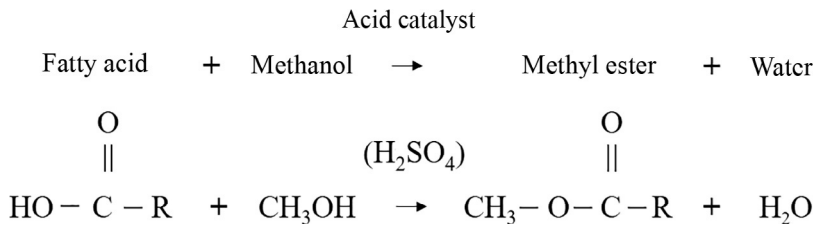


FIG. 6.5 Acid-catalyzed esterification reaction.

by base-catalyzed transesterification (Lam et al., 2010). NREL has recommended a recipe of reactants for the FFA pretreatment which is widely adopted by most biodiesel manufacturers: 2.25 g methanol and 0.05 g sulfuric acid for every gram of FFA in the WCO, equivalent to 19.8:1 methanol-to-FFA molar ratio and 5% acid-to-FFA weight percentage (Chai et al., 2014).

### 6.3.2.1 Determination of Acid Value/Fatty Acid Content

Free fatty acids content of waste cooking oil from institutional cafeterias has been determined to be lower than many other establishments (i.e., fast-food restaurants) as the cooking oil replacement rate should be faster. However, there are no specific guidelines or regulations on how often cooking oil should be replaced. Sanli et al. (2011) investigated the FFA content from different facilities; however, there are very limited data on free fatty acids values of WCO from institutions such as universities. Frank (2014) and Bruton (2014) measured FFA content of WCO from a university cafeteria, and measured 4.42 and 3.30 wt%, respectively. The acid value is defined as the amount of free fatty acid present in the oil requiring a computed mass of potassium hydroxide to neutralize it. This value is used to determine the amount of base catalyst to neutralize the acidity of a gram of raw material (Luque and Melero, 2012). The acid value (AV) is determined by applying Eq. (6.1) (Banani et al., 2015). A titration method is typically used to measure the FFA concentration and determine the fatty acid conversion during esterification. This method provides the amount of excess base catalyst required to neutralize the FFAs based on the initial concentration in the WCO. The extent of the acid esterification reaction can be determined by the acid value and the FFA conversion rate (Chai et al., 2014).

$$AV \text{ (mg KOH/g)} = \frac{56.1 \times C_{\text{KOH}} \times V_{\text{KOH}}}{m} \quad (6.1)$$

where

- 56.1 = molecular weight of the solution employed for titration (g/mol)
- $C_{\text{KOH}}$  = concentration of the titration KOH solution (g/mol)
- $V_{\text{KOH}}$  = volume of solution employed for titration (mL).
- $m$  = mass of the fatty acid sample (g)

The free fatty acid (FFA) conversion rate is calculated by Eq. (6.2):

$$\text{FFA conversion} = \frac{(\text{Initial FFA} - \text{Final FFA})}{\text{Initial FFA}} \times 100\% \quad (6.2)$$

where

- Initial FFA = initial free fatty acid value (mg KOH/g)
- Final FFA = final free fatty acid value (mg KOH/g)

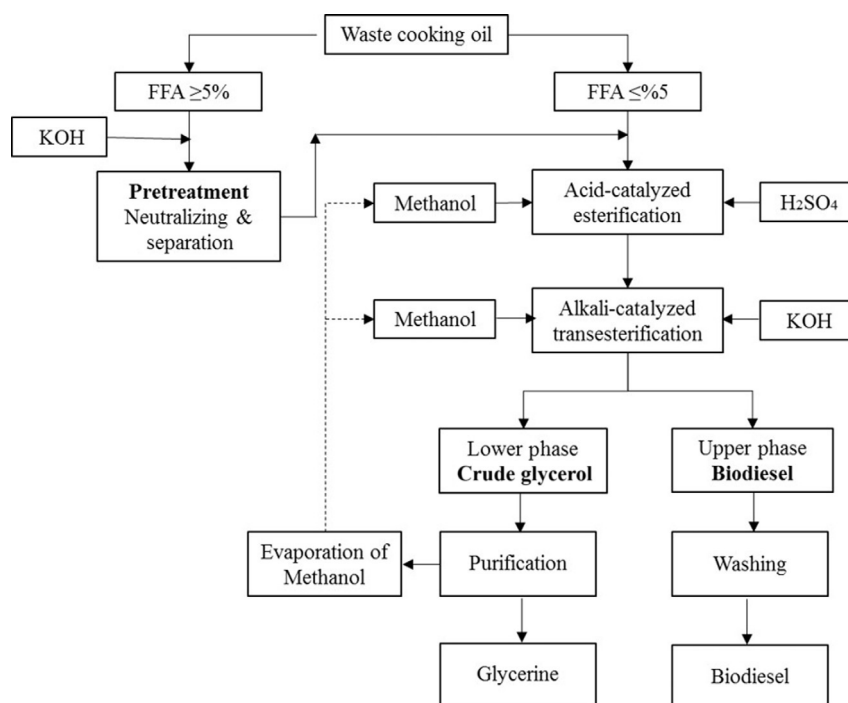
### 6.3.2.2 Two-Step Esterification/Transesterification

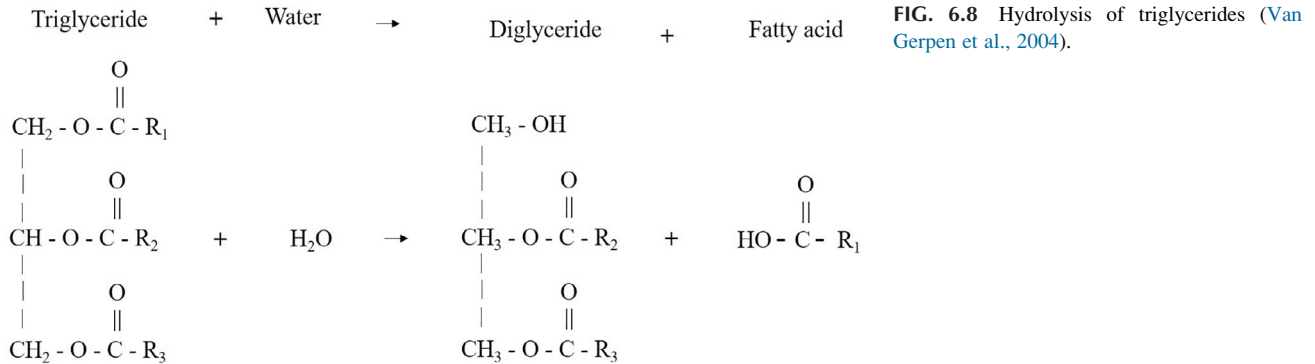
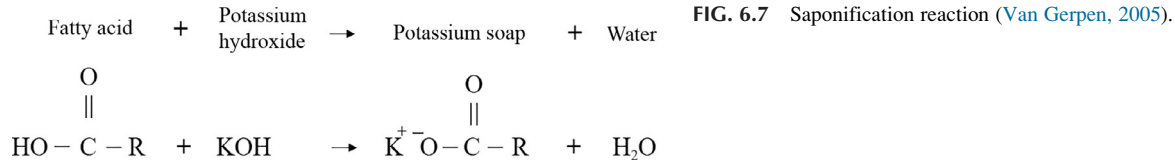
The conventional method of producing biodiesel from edible virgin oils today is homogeneous base-catalyzed transesterification on a larger production scale. In such systems, common base catalysts are sodium hydroxide (NaOH), sodium methoxide ( $\text{CH}_3\text{NaO}$ ), potassium hydroxide (KOH), and potassium methoxide ( $\text{CH}_3\text{KO}$ ). These catalysts are widely used because they provide fast reaction rate for a short process time (30–60 min), ability to run the process at lower temperature and atmospheric pressure, higher product yield and purity (Math et al., 2010). However, base catalysts are more effective with high purity reactants having <1 wt% free fatty acids and have generally performed better with virgin vegetable oils (Demirbas, 2009). When the waste cooking oil FFA content exceeds 1 wt%, a two-step catalyzed process is recommended. Acid catalysts are a better option if the initial feedstock oil has high FFA and/or water content. The most widely used acid catalysts are sulfuric acid, sulfonic acid, and hydrochloric acid. Unlike base catalysts, they are generally insensitive to FFA content and both oil and FFA can lead directly to the methyl ester (Chai et al., 2014). Longer reaction times, the requirement of a large amount of alcohol and lower yield makes acid-catalyzed reactions unattractive for large-scale biodiesel production. Fig. 6.6 shows the schematic flow diagram of two steps (esterification and transesterification process) biodiesel production from institutional waste cooking oil.

When the feedstock contains a significant amount of free fatty acids, the acid pretreatment step (acid esterification) is recommended to neutralize the free fatty acid content before proceeding to the “standard” transesterification reaction. As stated previously, many nonedible oils and low-quality feedstocks such as grease trap waste, animal fats, and waste cooking oils contain high free fatty acid content. Acceptable levels of FFA concentration in WCO should be lower than <5 wt% to achieve acceptable biodiesel yields (Lam et al., 2010). In the pretreatment process, free fatty acids in the oil are esterified to methyl ester with acid catalyst ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) in the presence of methanol while reducing the acid value (Fig. 6.5). Without this pretreatment step, excess free fatty acid in the raw oil would likely react with the alkali catalyst (KOH) through the saponification reaction to form alkali salts of fatty acids (soap) and water; Fig. 6.7. During this reaction, the catalyst is utilized by FFA and therefore water also inhibits the reaction which reduces the catalyst activity and leads to more difficulty in the separation process. Additionally, when there is water in the raw oil or it is generated during the saponification reaction, it will hydrolyze the triglycerides to form additional free fatty acid (Fig. 6.8).

As discussed in Section 6.2, feedstock characteristics have an important influence in determining the effectiveness of the biodiesel production process. Direct use of vegetable oils and animal fats as combustible fuel is generally not possible due to their high kinematic viscosity and low volatility compared to No. 2 diesel (Math et al., 2010). The reduction of viscosity can be achieved by transesterification of oil to produce biodiesel which has properties similar to diesel fuel. Furthermore, some feedstocks like jatropha, WCO, and animal fat have higher acid/FFA content which requires additional pretreatment process for biodiesel production. Table 6.4 shows typical physical and chemical properties of some common feedstocks. Generally, the reported properties of WCO, such as water, insolubles, unsaponifiables, phosphorous, and sulfur levels are all within acceptable ranges for biodiesel production and similar to the virgin oils. As shown in Table 6.5, the

FIG. 6.6 Overall schematic process flow for biodiesel production using institutional WCO.





**TABLE 6.4 Comparison of Physiochemical Properties of Different Feedstocks for Biodiesel Production**

Parameters	Units	Soybean	Palm	Jatropha	Microalgae ( <i>Spirulina platensis</i> )	Spent Coffee Oil	Waste Cooking Oil
Heating value	MJ/kg	39.6	39.3	37.01–38.73	41.36	23.10–38.22	41.40
Density (40 °C)	kg/m <sup>3</sup>	890–913	881–919	919.5–932	860	925*	924**
Kinematic Viscosity (40 °C)	mm <sup>2</sup> /s	28.08–32.6	39.4	35.62–51	5.66	42.65–49.64	36.4
Pour point	°C	–12.2	–	2	–18	7	11
Flash point	°C	254	252–267	242–274	130	>200	212
Cloud point	°C	–3.9	31.0	–	–	11–12.2	–
Cetane Number		37.9	42.0	–	–	–	49
Acid value	mgKOH/g oil	0.709	0.1	42.78	0.45	9.85–11.27	43.46
Free fatty acid	%	0.3545	7.5	21.5	–	0.412	1.32–5
References		[1]	[2]	[3]	[1]	[4]	[5]

[1] Verma and Sharma (2016); Kayode and Hart (2017); [2] Chai et al. (2014); Verma and Sharma (2016); Kayode and Hart (2017); [3] Verma and Sharma (2016); Chai et al. (2014); [4] Haile (2014); Somnuk et al. (2017) (\*Density at 30 °C; Vardon et al. (2013); [5] Demirbas (2009) (\*\*Density at 15 °C; Chai et al. (2014); Verma and Sharma (2016).

**TABLE 6.5 Selected Literature on Operating Parameters of Biodiesel Production From Different Feedstocks**

Feedstock	Method	Catalyst		Alcohol	Acid Catalyst (wt%)	Base Catalyst (wt%)	T (°C)	Reaction Time	Molar Ratio (Alcohol to Oil Ratio)	Yield (%)	
Soybean oil [1]	Esterification	Homogeneous acid	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Methanol	1	–	65	69 h	–	>90	
	Transesterification	Heterogeneous base	PbO	–	–	–	215		7:1	89	
		Heterogeneous acid	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /ZrO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	Methanol				250		40:1	90
		Biocatalyst (enzyme)	Lipozyme RMIM	Methanol	7	–	–	50	4 h	3:1	60
Rapeseed oil [2]	Transesterification	Homogeneous base	KOH	Methanol		0.7	30	2 h	9:1	97–98	
		Heterogeneous acid	ZnO	Methanol	–	–	225–230	6 h	20:1	94.3	
Palm oil [3]	Esterification	Ion-exchange resin catalyst	Amberlyst-15	Methanol	4	–	65	90 min	15:1		
	Transesterification	Homogeneous base	KOH	Methanol		1	60	60 min	6:1	88	
		Heterogeneous base	KNO <sub>3</sub> /KL zeolite					200	4 h	–	74
Jatropha [4]	Transesterification	Homogeneous base	KOH	Methanol	–	9	60–80	8 h	10:1		
		Heterogeneous base	Hydrotalcite particles with Mg/Al	Methanol		1	45	1.5 h	4:1	95.2	
<i>S. platensis</i> algae [5]	Transesterification	–	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Methanol	60	–	55	90 min	4:1	75	
Microalgae oil	Supercritical transesterification	–		Methanol			270–350		10:1–42:1	90.8	

Spent coffee grounds [6]	In situ transesterification	–	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Methanol	20	–	70	12 h	28.87 ml methanol/g oil	98.61
	In situ transesterification	–	NaOH	Methanol		3:1 catalyst to oil mole ratio	60	90 min	400:1	96.0
	Transesterification	1. Homogeneous acid 2. Homogeneous base	1. HCL 2. KOH	Methanol	10	1	54	90 min	20:1 9:1	82
WCO [7]	Two-step: 1. Acid esterification 2. Alkaline transesterification	1. Homogeneous acid 2. Homogeneous base	1. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2. KOH	Methanol	5	1.47	80	90 min	5:1	96
	Transesterification (used canola)	Homogenous base	NaOH	Methanol	–	0.08	60	20 min	28 mL per 100 mL of oil	94.5
	Transesterification (used sunflower)	Homogenous base	KOH	Methanol	–	1	25	30 min	6:1	Maximum
	Supercritical methanol transesterification			Methanol			286	2 h	6:1–41:1	99.6
	Transesterification	Heterogeneous base	CaO	Methanol		0.85%	60–65	1 h	12:1	66
	Transesterification	Heterogeneous acid	Zeolite Y (Y756)	Methanol	–	–	460	0.37 min	6:1	26.6
	Transesterification	Biocatalyst (enzyme)	Novozyme 435	–	4% based on oil mass	–	40	12 h	4:1	88
	Microwave-assisted transesterification	Heterogeneous alkali on the carbonized coconut shell	KOH/CS	Methanol	–	5	80	40 min	12:1	91.3

[1] Baskar and Aiswarya (2016); Kayode and Hart (2017); [2] Verma and Sharma (2016); Kayode and Hart (2017); [3] Gan et al. (2012); Verma and Sharma (2016); Kayode and Hart (2017); [4] Deng et al. (2011); Verma and Sharma (2016); [5] Verma and Sharma (2016); [6] Haile (2014); Liu et al. (2017); Najdanovic-Visak et al. (2017); [7] Demirbas (2009); Lam et al. (2010); Math et al. (2010); Bruton (2014); Kayode and Hart (2017); Babel et al. (2018).

**TABLE 6.6** Physiochemical Properties of Biodiesel Produced From Different Feedstocks

Parameters	Units	Edible Oils			Nonedible Oils		Other Sources (Waste Based)	
		Soybean	Rapeseed	Palm	Jatropha	Microalgae <i>Chlorella</i> sp.	Spent Coffee Oil	WCO
HHV	MJ/kg	39.8–41.3	–	–	–	39.5	35.4	42.65
LHV	MJ/kg	37	32.8–36.7	32.4–33.5	39.23		18.8	38.05
Density (15°C)	kg/m <sup>3</sup>	865–880	882*	873–877	875	883	880	897
Kinematic viscosity (40°C)	mm <sup>2</sup> /s	4–5.2	4.83	4.71	4.4	4.73	5.4	5.3
Pour point	°C	–4	–10.8	12	2	–	2.0	–11.15
Flash point	°C, min	168–185	155	135	163	179	200	196
Cloud point	°C	–0.5	–4	16	4	–	13	–
Cetane number		45–60.9	52.9	57.3	57.1	–	505–51.9	54
Acid value	mg KOH/g	–	–	0.08	0.4	0.37	0.3–0.7	0.10
Reference		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]

[1] Lin et al. (2011); Bruton (2014); [2] Fukuda et al. (2001); Lin et al. (2011); (\*Density at 21°C); [3] Fukuda et al. (2001); Gui et al. (2008); Lin et al. (2011); [4] Gui et al. (2008); Lin et al. (2011); [5] Islam et al. (2017); [6] Kondamudi et al. (2008); Vardon et al. (2013); Haile (2014); Kang et al. (2017); Liu et al. (2017); Somnuk et al. (2017); [7] Demirbas (2009); Bruton (2014).

varying feedstock properties dictate the use of different transesterification processes and operating parameters, which in turn result in final biodiesel products with different ranges of critical properties such as density, viscosity, pour point, flash point, and cetane number (Table 6.6). Comparison between the data in Tables 6.4 and 6.6 indicates that the relatively high kinematic viscosity of vegetable oil feedstocks is reduced after transesterification.

## 6.4 USES OF BIODIESEL

Global demand for transportation fuels has been growing and is expected to increase from 124 billion liters in 2015 to 202 billion liters by 2024 (Verma and Sharma, 2016). The rise in crude oil demand, and the attendant GHG emissions, provide strong motivations to find alternative fuels. The U.S. Renewable Fuel Standard (RFS) mandates that renewable energy fuels in the U.S. transportation sector should provide a minimum use of 136 billion liters (36 billion gallons) by 2022. Biodiesel has been recognized as the best alternative to ultra-low sulfur diesel (ULSD) and provides many advantages over diesel fuel which include lower sulfur content, no aromatic content, biodegradability, and miscibility with petroleum-based diesel in all blend ratios. Also, the lack of significant modifications required for diesel engines or gen-sets makes biodiesel the most attractive renewable fuels over other available options, although there is an approximately 10% lower energy content compared to petroleum diesel fuel (Math et al., 2010). Global biodiesel production has continued to rise even as crude oil prices have dropped since mid-2014. As of 2015, the United States produced 4.8 billion liters (1.3 billion gallons) of biodiesel and contributed 15% of global production (Naylor and Higgins, 2017).

Biodiesel has largely developed as an alternative transportation fuel, although it has numerous potential uses which include space heating, and a small quantity of biodiesel is used in lubricants, plasticizers, high boiling absorbents for cleaning of gaseous industrial emissions, and other solvent applications (Knothe and Razon, 2017). Current utilization pathways for biodiesel are in automotive diesel engines for transportation and diesel generators for off-grid or stand-alone



**TABLE 6.7** Characterization of Waste Cooking Oil-Based Biodiesel From an Institution and Standard Specification for Biodiesel (Demirbas, 2009; Bruton, 2014)

Test Name	Units	Test Methods	ASTM D6751	WCO	Biodiesel From WCO	No. 2 Diesel Oil
Free glycerin	(mass %)	D6584	MAX 0.020	–	0.000	–
Monoglycerides	(mass %)	D6584	N/A	–	0.078	–
Diglycerides	(mass %)	D6584	N/A	–	0.013	–
Triglycerides	(mass %)	D6584	N/A	–	0.007	–
Total glycerin	(mass %)	D6584	MAX 0.240	–	0.098	–
Density (15°C)	kg/m <sup>3</sup>	D1298	–	924	890	75–840
Viscosity (40°C)	mm <sup>2</sup> /s	D445	1.9–6.0	36.4	5.3	1.9–4.1
Pour point	(°C)	D93	MIN 93	11	-11.2	-13 to -19
Flash point	(°C)	D93	MIN 93	212	196	67–85
Cloud point	(°C)	D2500	N/A	–	1	–
Cetane number		D976	MIN 47	49	54	40–46
Sulfur content	%	D5453	MAX 15	0.09	0.001	0.35–0.55
Carbon residue	(mass %)	D4530	MAX 0.050	0.46	0.05	0.35–0.40
Water content	(volume %)	D2709	MAX 0.050	0.42	0	0.02–0.05
Acid value/FFA	(mg KOH/g)	D664	MAX 0.50	1.32	0.10	–
HHV	(MJ/g)	–	–	41.40	38	45.62–46.48

electricity generation, especially in developing countries. The most considerable constraint encountered in converting waste cooking oil to biodiesel for heating fuel is blending regulations to produce diesel-based heating oil (commonly referred to as No. 2 heating oil). In the United States, a mixture blend constraint exists for heating oil, because only 2%–10% v/v biodiesel blend is required (EIA, 2017).

European standard EN 14214 and American standard ASTM D6751 specify quality metrics for biodiesel and have served as reference standards worldwide. These standards consider the variation of fuel quality influenced by pretreatment processes for feedstock oils, the transesterification reaction itself, and any posttreatment processes (Bart et al., 2010). For instance, density, kinematic viscosity, cetane number (CN), cold flow, and oxidative stability are all comprehended in the standards and are directly related to the composition of the input feedstock. Biodiesel (B20) can viably be used without the limitation of cloud point and pour point and may also be directly used in engines without further modifications. The disadvantages are cold flow issues at low temperatures and higher concentrations of oxides of nitrogen (NO<sub>x</sub>) during combustion. As shown in Table 6.7, reported properties of crude WCO, biodiesel from WCO, and commercial diesel fuel were in accordance with the ASTM standards.

## 6.5 UTILIZATION OF BY-PRODUCT GLYCEROL

Glycerol (1,2,3-propanetriol) is the simplest trihydric alcohol containing two primary and one secondary hydroxyl groups, and is the main component of triglycerides, usually found in vegetable oils and animal fats. It can be obtained from soap manufacturing, fatty acid production, fatty ester production, microbial fermentation and can be synthesized from propylene oxide (Crocker, 2010). Similar to petroleum fuel production, processing of biodiesel generates by-products, with glycerol being one of the main by-products generated from the homogeneous base-catalyzed transesterification reaction. Fundamentally, for every 3 mol of methyl esters, 1 mol of glycerol is produced, which is approximately 10–20 wt% of the total product (Gholami et al., 2014; Quispe et al., 2013). Every 100 lbs (45 kg) of biodiesel produced generates approximately 10 lbs (4.5 kg) of glycerol. Crude glycerol typically contains 65%–85% w/w glycerol content, with other constituents including

methanol, salt, and various impurities. One of the primary drawbacks of homogenous base-catalyzed transesterification is that glycerol separation is not efficient and requires significant secondary processing to achieve low levels of contamination.

### 6.5.1 Types of Glycerol and Their Uses

Glycerol generated as a by-product of the transesterification reaction can be categorized into three main groups: crude glycerol, technical glycerol, and purified glycerol (Fig. 6.9). In the current market, crude glycerol generated from biodiesel production is sold with methanol concentration of 0.3% (max) and glycerol concentration of 80%–88% purity (min) for lower grade applications. It has very little economic value because of various impurities, but can be further purified to achieve a higher market level. Technical grade glycerol is sold with methanol concentration of 0.1% (max) and glycerol concentration of 95% purity (min) for industrial applications. United States Pharmacopeia (USP) and Food Chemicals Codex (FCC) grade refined glycerol with 99.7% purity (min) is used in cosmetics, pharmaceuticals, and food (Gholami et al., 2014; Quispe et al., 2013).

Glycerol is used in many applications from energy bars to cough syrups to sealants for boat coatings (Gholami et al., 2014). However, the low-grade crude glycerol available directly from biodiesel production cannot be used for food, pharmaceutical, and cosmetic products because of its associated impurities. For large-scale biodiesel producers, crude glycerol can be purified by conventional methods in their manufacturing sites or sent to large refineries to produce a higher grade coproduct that can then be distributed in markets for other industries. Due to the current surplus of crude glycerol on the worldwide market, the capacity of refineries could well reach their production limits. The process of converting and refining crude glycerol into a pure form is usually cost prohibitive for small- and medium-sized scale biodiesel producers. Hence, the development of effective utilization strategies for crude glycerol might be a possible solution for producers in improving the economics of biodiesel manufacturing.

### 6.5.2 Process of Refining Crude Glycerol

Various kinds of glycerol purification methods and technologies are available in the market today, such as neutralization, acidification, ion exchange resins, vacuum distillation/evaporation, and membrane separation. The combination of more than one method can enhance the process and increase the purity level to as high as 99.2% (Wan Isahak et al., 2014). Distillation is the most common and mature technology, but the drawback is that it is highly energy intensive and consumes a large amount of water during condensation. Purification processes of crude glycerol generally require significant energy input, are high in chemical consumption, and have high production costs. The development of cheap and efficient purification processes that can be deployed at scale is essential to the biodiesel industry because they offer potential for additional economic benefits in generating secondary value-added products (Saifuddin et al., 2014).

Purification of crude glycerol generated by an institutional-scale biodiesel process developed in our laboratory was achieved by chemical treatment combined with vacuum distillation, as described by Hunsom et al. (2013) with additional modifications extracted from the literature (Tiangfen et al., 2013; Manosak et al., 2011; Kongjao et al., 2010; Marbun et al., 2014; Hajek and Skopal, 2010; Yang et al., 2013), following these steps:

- (1) Acidification
- (2) Neutralization
- (3) Vacuum distillation, and
- (4) Activated carbon adsorption.

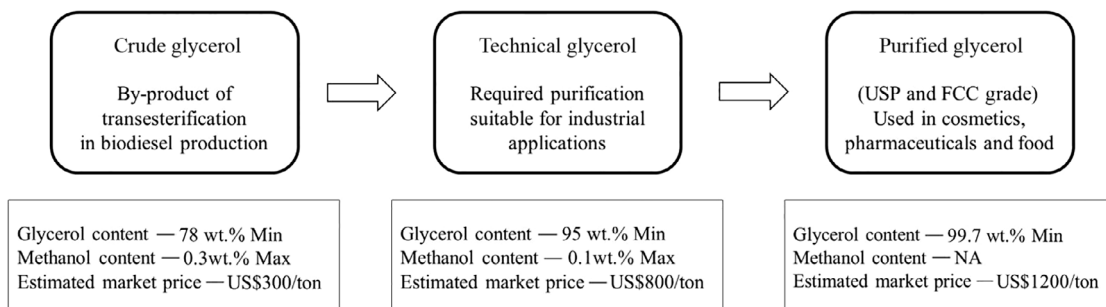
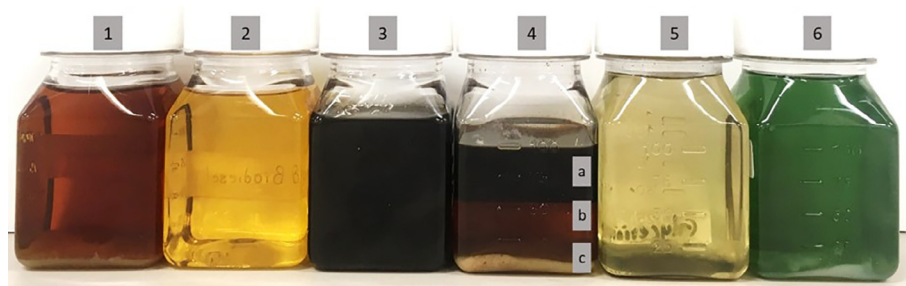


FIG. 6.9 Types of glycerol with their end applications.



**FIG. 6.10** (1) Waste cooking oil (WCO); (2) biodiesel; (3) crude glycerol; (4) separated layers: (a) FFA; (b) glycerol; (c) salt; (5) refined glycerol; (6) liquid glycerin soap.

Figs. 6.10 and 6.11 illustrate the overall process of converting crude glycerol to purified glycerol in an institutional-scale process. Crude glycerol from biodiesel production was acidified with  $\text{H}_3\text{PO}_4$  and left for 12 h before phase separation. After complete separation, the upper phase consisted of free fatty acid, methanol, water, and acids, while the middle phase was a glycerol-rich layer with some methanol, water, and salt, and it had a dark brown color. The lower phase also had a small fraction of an inorganic salt-rich layer with a high concentration of potassium phosphate. The final purified glycerol by-product was obtained from the middle layer after adsorption with activated carbon. Each of these process steps is described in more detail as follows.

#### *Step 1: Acidification.*

A phosphorus acid solution (85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich) was added to improve the acidity of crude glycerol. This produced three distinct layers: free fatty acid top layer (FFA), glycerol-rich middle layer, and inorganic salt-rich bottom layer. A filter funnel with pore size between 70 and 100  $\mu\text{m}$  was used to remove the precipitated salt from the mixture and to separate the upper layer from the glycerol-rich middle layer. These two layers were then poured into the separation funnel to remove the glycerol-rich layer for further processing.

#### *Step 2: Neutralization.*

The glycerol layer was then neutralized by the addition of 12.5 M NaOH to achieve the required pH and remove the precipitated salts.

#### *Step 3: Vacuum distillation.*

The methanol and water from the glycerol were removed using two methods. In the first method, the glycerol solution was placed on a hot plate at 100°C for 2 h to release both methanol and water in a chemical hood. In the second method, the glycerol solution was placed in a vacuum distillation unit to extract the excess methanol at 60°C for 50 to 60 min at 95°C, and then to remove the water for 50–60 min at a pressure of 3 kPa. From an environmental standpoint, the latter method should perform better, as excess methanol can be recovered and reused in the biodiesel process.

#### *Step 4: Activated carbon adsorption.*

The glycerol solution obtained from the prior process steps was then passed through a column of commercially available activated carbon to remove odor, color, and other impurities and yield viscous, nearly colorless and odorless glycerol solution. Activated carbon can also be reused in the process at least a few times, provided the color and purity of the product glycerol are closely monitored.

### 6.5.3 Saponification

Soap is produced by the saponification of triglyceride from animal fat or vegetable oil (Fig. 6.12), wherein fatty acids react with NaOH or KOH to produce glycerol, fatty acid, and salts; 10%–15% of glycerol is produced during the saponification process. However, most commercial soap manufacturers remove and sell the glycerol, or convert it into more profitable beauty products. Glycerin serves as a humectant, attracting moisture from the environment to the surface layers of the skin and hair (Lodén and Maibach, 1999) and has cleansing, lubricating, and soothing properties. Glycerol by-product soap from biodiesel production would typically have more glycerin than traditional soap that has only 10%–20% glycerin content (Failor, 2000; Nicely, 2009). Different vegetable oils or animal fats, catalysts (NaOH/KOH), and glycerin grades can be used to produce soap (Fig. 6.13). The ingredients are chosen depending on the individual preference and the economic value of the desired product (Win et al., 2015).

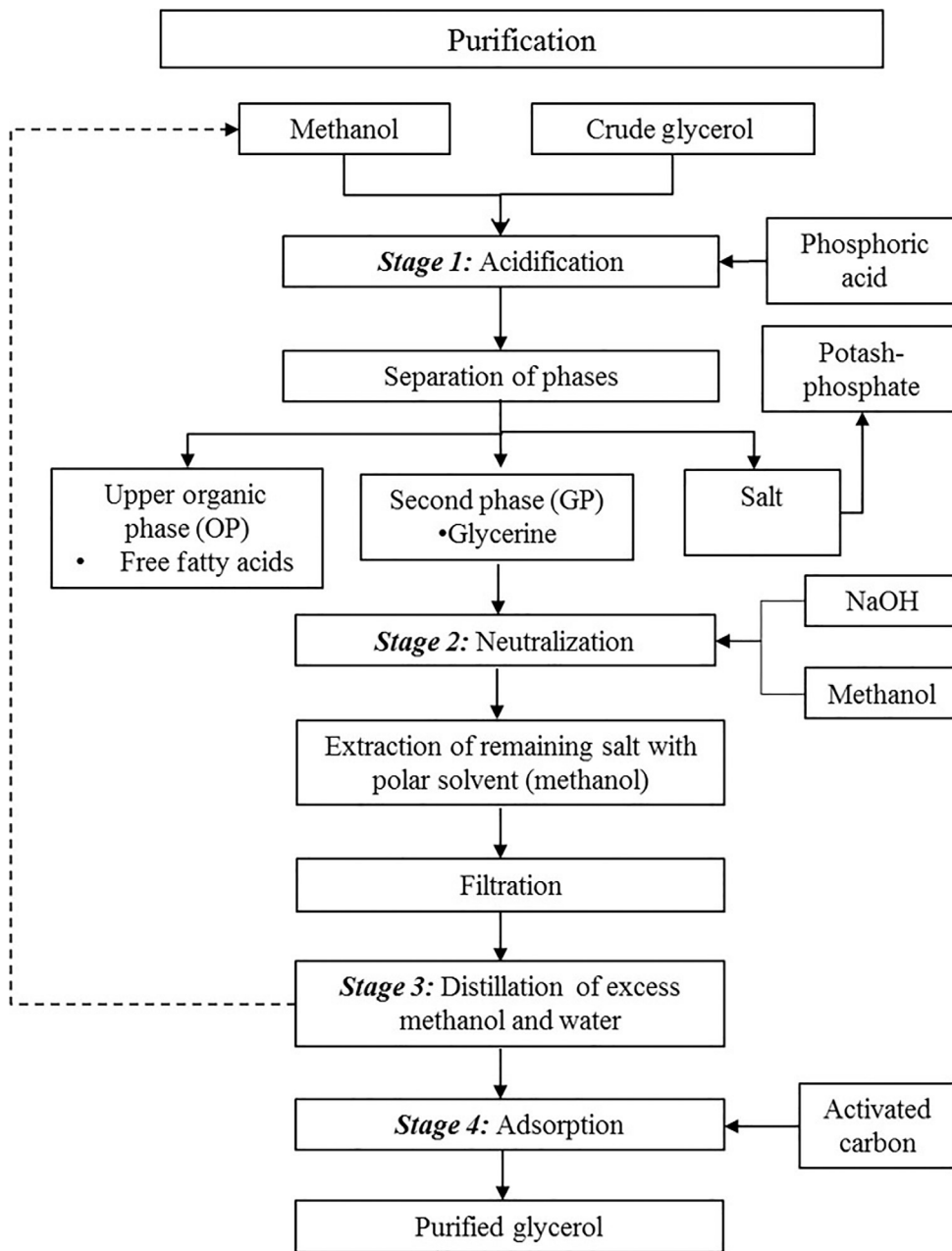


FIG. 6.11 Schematic diagram of glycerol purification process flow.

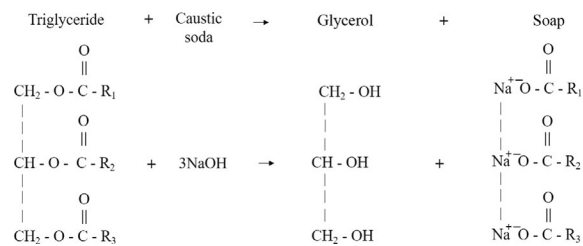


FIG. 6.12 Basic reaction of the saponification process (Tan et al., 2013).

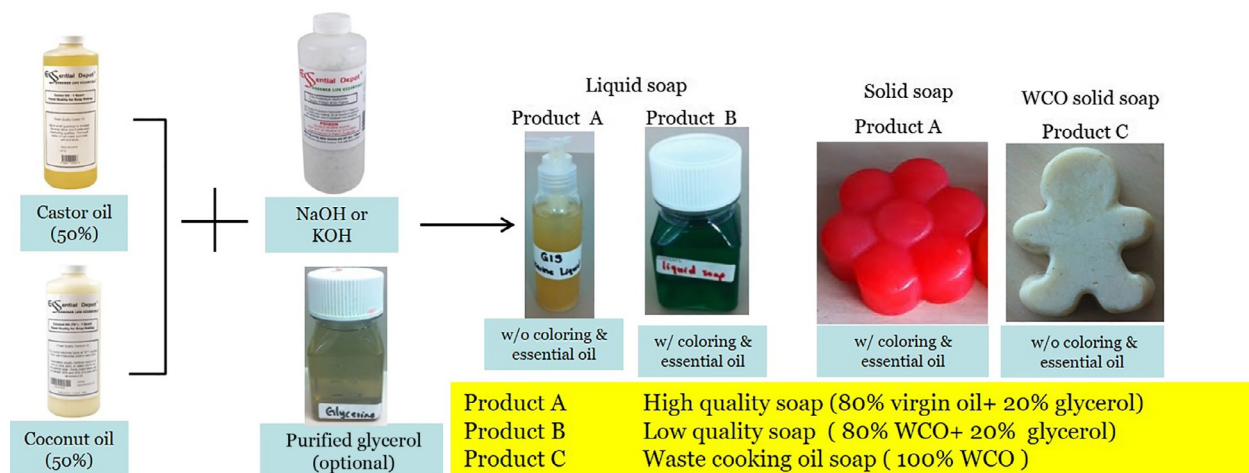


FIG. 6.13 General flowchart of the saponification process.

## 6.6 FUTURE PERSPECTIVE AND RESEARCH NEEDS

Waste cooking oil (WCO)-to-biodiesel conversion is not a new technology and has been implemented at the scale of individual WCO generating facilities, to community-scale plants, to large commercial enterprises. A wide diversity of research studies have been conducted in many different areas related to WCO-based biodiesel production. However, there are relatively few studies of WCO-to-biodiesel production in a constrained system at small scale (i.e., community scale), and few, if any, studies have considered the effect of utilizing by-product crude glycerol in saponification, to produce a secondary product that can enhance the economic and environmental performance of the overall system.

Crude glycerol from biodiesel production plants contains 80% glycerol in the best scenario and between 20% and 40% impurities. Purified through the costly refining process to cosmetic or pharmaceutical quality is generally not financially viable. Much research has been targeted on biodiesel production utilized for different applications, and other focused studies on conversion of low-value by-product crude glycerol into valued-added products. Many published papers have discussed ways to utilize crude glycerol from biodiesel production, and producing low-cost soap from edible or nonedible vegetable feedstocks in developing countries has already been implemented. Nonetheless, what has been minimally explored is the potential synergy between two waste products (WCO and crude glycerol) and converting the waste resources into two value-added products (biodiesel and soap), to determine the effect on economic development, resilience, energy independence, and waste for a constrained community-scale system.

Institutions generate waste cooking oil (WCO) from dining services and have few disposal options. The waste oil can properly be disposed at the facilities described previously, which can be costly, or sold for animal feed production for a small revenue. The development of a closed-loop biodiesel production system utilizing crude glycerol as an ingredient for soap production is compelling, especially in a constrained system where the WCO feedstock supply and biodiesel demand are in close proximity and controlled by a single entity. Biodiesel can be used in vehicles and other applications, while crude glycerol can be refined and used to produce soap. Potentially, the soap can be used in cafeterias and bathrooms across campus and dining services, to provide significant financial benefits beyond producing biodiesel fuel alone.

A case study of a community-based biodiesel production program in Atlanta, Georgia (GA) was conducted by [Fyfe et al. \(2006\)](#) to determine the opportunity to recycle yellow grease into biodiesel for urban fleets and other diesel users. The development of this yellow grease program in an urban area was likely to have potential based on the strong interest from the restaurant industry, with high grease volumes generated from nearby restaurants and Emory University, and diesel demand from the local public school buses. In another study, [Skarlis et al. \(2012\)](#) investigated the viability of a small-scale biodiesel production plant (10,000 ton/year) on the Greek island of Crete. They found that a small-scale plant would offer opportunities for decentralized rural development, which is important for the Greek economy. The investment of a small-scale project was found to be viable, as long as the biodiesel market value is consistently higher than the biodiesel production cost value. [Schut et al. \(2011\)](#) discussed the opportunities and constraints to implementing a sustainable community-based biofuel production and utilization in the Nhambita community in Mozambique. They developed three scenarios to understand how much jatropha oil production is needed to replace fossil fuels with pure plant oil (PPO) and to locally manufacture oil-based products such as soap. More rigorous economic and environment assessments should be

**TABLE 6.8** Summary of U.S. Institutions With WCO-to-Biodiesel and Soap Programs

University	Location	Feedstock Source	Biodiesel Production Capacity	Facilities	Utilization and Benefits	Crude Glycerol Utilization
University of Arizona	Tucson, AZ	NA	NA	NA	NA	Produce soap
Appalachian State University	Boone, NC	NA	NA	NA	House heating systems and farm equipment	Produce soap and use in composting
Dickinson College	Carlisle, PA	WCO from dining services	5000 gal	Students manage production operation	NA	Produce soap for campus bathrooms and use in composting
Loyola University	Chicago, IL	WCO from Loyola, Northwestern University, and donation from neighborhood	10,000 gal	Student-run enterprise. First and only university operation licensed to sell biodiesel in the U.S. and a certified green business with the Illinois Green Business Association.	B100 (55–500 gal) is available for sale and also utilized in campus shuttle buses and a boiler in the Institute of Environmental Sustainability	Produce soap (marketed as BioSoap)
Clemson University	Clemson, SC	WCO from dining halls and local businesses	3000 gal per year in 90 gal batches	Student-run enterprise. Produce 20%–33% mix (i.e., 20%–33% biodiesel and 67%–80% diesel), with some vehicles running 100% biodiesel	Diesel trucks within fleet of vehicles on campus, landscaping, and utility trucks	Produce soap
Santa Fe College	Gainesville, FL	WCO from cafeteria	NA	Conduct biodiesel courses and provide education opportunities for students	Two fleet vehicles running with biodiesel	NA
Rochester Institute of Technology	Rochester, NY	WCO from cafeteria	5000 gal per year	Researchers produced biodiesel that met ASTM standards for vehicle use and heating fuel blends.	Performance of biodiesel was tested using campus vehicles and space heating appliances	Crude glycerol purified to produce soap of varying quality

conducted to determine the financial performance and environment impacts over the entire energy cycle, from WCO collection to biodiesel production and crude glycerol utilization. Table 6.8 provides a summary of universities in the United States that are currently producing biodiesel from waste cooking oil, and a few also have parallel soap production operations.



## 6.7 CONCLUSIONS

Today biodiesel offers one of the best substitutes for conventional transportation fuels because its physical and chemical properties are very similar to diesel fuel. The major disadvantages associated with biodiesel production are the high raw material cost and limited availability of vegetable oils resources that do not compete with food commodities. The high raw material cost is also due to high global biodiesel demand in blended mixtures with petroleum-based diesel, usually up to 20% in the U.S. (B20). In the future, vegetable oil prices are unlikely to be low enough for biodiesel produced from such feedstocks to compete with petroleum fuels, unless financial support from governments is made available (i.e., subsidies and tax credits). One of the widely accepted ways to reduce the raw material cost is the use of waste cooking oil (WCO) as a feedstock for biodiesel production.

Low-grade waste cooking oil is not as desirable as edible oils for biodiesel feedstock because of its generally high level of impurities. However, the growing volume of waste cooking oil generated by domestic and industrial operations due to the trend of increasing population growth has received a lot of attention. WCO has been facing serious disposal problems in many parts of the world, and proper management and utilization of this widely generated food supply chain waste material are urgently needed. Recycling of the waste cooking oil provides not only the benefit of producing a renewable energy resource that can displace high-GHG emitting transportation fuels, but also helps address a serious waste disposal problem. The importance of looking beyond the profitability and quality of oils for biodiesel production to address other benefits is essential. It has been shown that utilization of glycerol, widely considered a low-value output of the transesterification process, is essential to the economic viability of WCO-to-biodiesel conversion at small scale. The development of waste cooking oil-based biodiesel production in a community biorefinery system could contribute to sustainable waste management practices and also provide positive microeconomic outcomes for local populations.

## REFERENCES

- Ashokkumar, V., Agila, E., Sivakumar, P., Salam, Z., Rengasamy, R., Ani, F.N., 2014. Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Convers. Manag.* 88, 936–946.
- Atabani, A.E., Mahlia, T.M.I., Badruddin, I.A., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Lee, K.T., 2013. Investigation of physical and chemical properties of potential edible and non-edible feedstocks for biodiesel production, a comparative analysis. *Renew. Sust. Energy Rev.* 21, 749–755.
- Babel, S., Arayawate, S., Faedura, E., Sudrajat, H., 2018. Microwave-assisted transesterification of waste cooking oil for biodiesel production. In: Ghosh, S. (Ed.), *Utilization and Management of Bioresources*. Springer, Singapore.
- Banani, R., Youssef, S., Bezzarga, M., Abderrabba, M., 2015. Waste frying oil with high levels of free fatty acids as one of the prominent sources of biodiesel production. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (4), 1178–1185.
- Bart, J.C., Palmeri, N., Cavallaro, S., 2010. *Biodiesel Science and Technology: From Soil to Oil*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Oxford.
- Baskar, G., Aiswarya, R., 2016. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. *Renew. Sust. Energy Rev.* 57 (2016), 496–504.
- Brorsen, W., 2015. Projections of US Production of Biodiesel Feedstock. Report prepared for Union of Concerned Scientists and The International Council on Clean Transportation.
- Bruton, D.J., 2014. Waste Cooking Oil-To-Biodiesel Conversion for Space Heating Applications. M.S. Sustainable Systems thesis, Rochester Institute of Technology.
- Chai, M., Tu, Q., Lu, M., Yang, Y.J., 2014. Esterification pretreatment of free fatty acid in biodiesel production, from laboratory to industry. *Fuel Process. Technol.* 125, 106–113.
- Crocker, M. (Ed.), 2010. *Thermochemical Conversion of Biomass to Liquid Fuels and Chemicals* (No. 1). The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- de Araújo, C.D.M., de Andrade, C.C., e Silva, E.D.S., Dupas, F.A., 2013. Biodiesel production from used cooking oil: a review. *Renew. Sust. Energy Rev.* 27, 445–452.
- Demirbas, A., 2009. Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical methanol transesterification. *Energy Convers. Manag.* 50 (4), 923–927.
- Deng, X., Fang, Z., Liu, Y.H., Yu, C.L., 2011. Production of biodiesel from *Jatropha* oil catalyzed by nanosized solid base catalyst. *Energy* 36 (2), 777–784.
- DoE, U.S., 2014. Annual Energy Outlook 2014 With Projections to 2040. US Energy Information Administration, US Department of Energy, Washington, DC.
- Energy Information Administration (EIA), 2017. Monthly biodiesel production report. In: *Inputs to Biodiesel Production*. Various Years.
- Enweremadu, C.C., Mbarawa, M.M., 2009. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—a review. *Renew. Sust. Energy Rev.* 13 (9), 2205–2224.
- European Environment Agency (EEA), 2017. *Landscapes in Transition—An Account of 25 Years of Land Cover Change in Europe*.
- Failor, C., 2000. *Making Natural Liquid Soaps: Herbal Shower Gels, Conditioning Shampoos, Moisturizing Hand Soaps, Luxurious Bubble Baths, and More*. Storey Publishing, North Adams, MA.
- Frank, D.E., 2014. Waste Cooking Oil-To-Biodiesel Conversion for Institutional Vehicular Applications. M.S. Sustainable Systems thesis, Rochester Institute of Technology.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92 (5), 405–416.

- Fyfe, E., Smith, B., Eisen, A., Pritchard, R., 2006. Community-Based Biodiesel Production from Restaurant Yellow Grease in Atlanta, Georgia. Emory University, Atlanta, Georgia.
- Gan, S., Ng, H.K., Chan, P.H., Leong, F.L., 2012. Heterogeneous free fatty acids esterification in waste cooking oil using ion-exchange resins. *Fuel Process. Technol.* 102, 67–72.
- Gholami, Z., Abdullah, A.Z., Lee, K.T., 2014. Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 39, 327–341.
- Gnanaprakasam, A., Sivakumar, V.M., Surendhar, A., Thirumarimurugan, M., Kannadasan, T., 2013. Recent strategy of biodiesel production from waste cooking oil and process influencing parameters: a review. *J. Energy* 2013, 1–10. Article ID 926392.
- Gui, M.M., Lee, K.T., Bhatia, S., 2008. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy* 33 (11), 1646–1653.
- Haile, M., 2014. Integrated volarization of spent coffee grounds to biofuels. *Biofuel Res. J.* 1 (2), 65–69.
- Hajek, M., Skopal, F., 2010. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101 (9), 3242–3245.
- Hunsom, M., Saila, P., Chaiyakam, P., Kositan, W., 2013. Comparison and combination of solvent extraction and adsorption for crude glycerol enrichment. *Center Excell. Petrochem. Mater. Technol.* 3 (2), 364–371.
- Islam, M.A., Heimann, K., Brown, R.J., 2017. Microalgae biodiesel: current status and future needs for engine performance and emissions. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 79, 1160–1170.
- Kang, S.B., Oh, H.Y., Kim, J.J., Choi, K.S., 2017. Characteristics of spent coffee ground as a fuel and combustion test in a small boiler (6.5 kW). *Renew. Energy* 113, 1208–1214.
- Karmakar, A., Karmakar, S., Mukherjee, S., 2010. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101 (19), 7201–7210.
- Kayode, B., Hart, A., 2017. An overview of transesterification methods for producing biodiesel from waste vegetable oils. *Biofuels*, 1–19.
- Keera, S.T., El Sabagh, S.M., Taman, A.R., 2011. Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst. *Fuel* 90 (1), 42–47.
- Knothe, G., Razon, L.F., 2017. Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 58, 36–59.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S.K., Misra, M., 2008. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *J. Agric. Food Chem.* 56 (24), 11757–11760.
- Kongjao, S., Damronglered, S., Hunsom, M., 2010. Purification of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant. *Korean J. Chem. Eng.* 27 (3), 944–949.
- Lam, M.K., Lee, K.T., Mohamed, A.R., 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnol. Adv.* 28 (4), 500.
- Leung, D.Y., Wu, X., Leung, M.K.H., 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energy* 87 (4), 1083–1095.
- Lim, S., 2017. Post-Event Report. Inida, Oils and Fats International (OFI).
- Lim, S., Teong, L.K., 2010. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: an overview. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14 (3), 938–954.
- Lin, L., Cunshan, Z., Vittayapadung, S., Xiangqian, S., Mingdong, D., 2011. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Appl. Energy* 88 (4), 1020–1031.
- Liu, Y., Tu, Q., Knothe, G., Lu, M., 2017. Direct transesterification of spent coffee grounds for biodiesel production. *Fuel* 199, 157–161.
- Lodén, M., Maibach, H.I. (Eds.), 1999. *Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function*. CRC Press, New York.
- Luque, R., Melero, J.A. (Eds.), 2012. *Advances in Biodiesel Production: Processes and Technologies*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Manosak, R., Limpattayanate, S., Hunsom, M., 2011. Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption. *Fuel Process. Technol.* 92, 92–99.
- Marbun, B.T., Hutapea, P.A., Aristya, R., Husin, R., 2014. Purification and physio-chemical characterization of glycerol by-product of palm oil biodiesel industry as potential base fluid for synthetic oil-based drilling fluid system. *Am. J. Oil Chem. Technol.* 1(10).
- Math, M.C., Kumar, S.P., Chetty, S.V., 2010. Technologies for biodiesel production from used cooking oil—a review. *Energy Sustain. Dev.* 14 (4), 339–345.
- Mohammadshirazi, A., Akram, A., Rafiee, S., Kalhor, E.B., 2014. Energy and cost analyses of biodiesel production from waste cooking oil. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 33, 44–49.
- Mussngug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56.
- Najdanovic-Visak, V., Lee, F.Y.L., Tavares, M.T., Armstrong, A., 2017. Kinetics of extraction and in situ transesterification of oils from spent coffee grounds. *J. Environ. Chem. Eng.* 5 (3), 2611–2616.
- Naylor, R.L., Higgins, M.M., 2017. The political economy of biodiesel in an era of low oil prices. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 77, 695–705.
- Nicely, R., 2009. *Making Biodiesel Soap*. Knice-N-Clean Soap Company.
- NREL, 2018. *Alternative Fuels Data Center: Maps and Data*. The Biofuels Atlas.
- Quispe, C.A., Coronado, C.J., Carvalho Jr., J.A., 2013. Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 27, 475–793.
- Saifuddin, N., Refal, H., Kumaran, P., 2014. Rapid purification of glycerol by-product from biodiesel production through combined process of microwave assisted acidification and adsorption via chitosan immobilized with yeast. *Res. J. Appl. Sci. Eng. Technol.* 7, 593–602.
- Sanli, H., Canakci, M., Alptekin, E., 2011. Characterization of waste frying oils obtained from different facilities. *World Renewable Energy Congress-Sweden*; 8–13 May; 2011; Linköping; Sweden. vol. 057. Linköping University Electronic Press, pp. 479–485.
- Schut, M., van Paassen, A., Leeuwis, C., Bos, S., Leonardo, W., Lerner, A., 2011. Space for innovation for sustainable community-based biofuel production and use: lessons learned for policy from Nhambita community, Mozambique. *Energy Policy* 39 (9), 5116–5512.



- Skarlis, S., Kondili, E., Kaldellis, J.K., 2012. Small-scale biodiesel production economics: a case study focus on Crete Island. *J. Clean. Prod.* 20 (1), 20–26.
- Somnuk, K., Eawlex, P., Prateepchaikul, G., 2017. Optimization of coffee oil extraction from spent coffee grounds using four solvents and prototype-scale extraction using circulation process. *Agric. Nat. Resour.* 51 (3), 181–189.
- Tan, H.W., Aziz, A.A., Aroua, M.K., 2013. Glycerol production and its applications as a raw material: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 27, 118–127.
- Tiangfen, C., Huipei, L., Hua, Z., Kejian, L., 2013. Purification of crude glycerol from waste cooking oil based biodiesel production by orthogonal test method. *Chin. Pet. Process Pe. Technol.* 15 (1), 48–53.
- Tsoutsos, T.D., Tournaki, S., Paraíba, O., Kaminaris, S.D., 2016. The used cooking oil-to-biodiesel chain in Europe assessment of best practices and environmental performance. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 54, 74–83.
- Tuntiwiwattanapun, N., Usapein, P., Tongcumpou, C., 2017. The energy usage and environmental impact assessment of spent coffee grounds biodiesel production by an in-situ transesterification process. *Energy Sustain. Dev.* 40, 50–58.
- United States Department of Energy, 2014. Clean Cities Alternative Fuel Price Report.
- Van Gerpen, J., 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Process. Technol.* 86 (10), 1097–1107.
- Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D., Knothe, G., 2004. Biodiesel Production Technology. Golden, Colorado. NREL/SR-510-36244.
- Vardon, D.R., Moser, B.R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R.L., Strathmann, T.J., Rajagopalan, K., Sharma, B.K., 2013. Complete utilization of spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1 (10), 1286–1294.
- Verma, P., Sharma, M.P., 2016. Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 62, 1063–1071.
- Wallace, T., Gibbons, D., O'Dwyer, M., Curran, T.P., 2017. International evolution of fat, oil and grease (FOG) waste management—a review. *J. Environ. Manag.* 187, 424–435.
- Wan Isahak, W.N.R., Ramli, Z.A.C., Ismail, M., Mohd Jahim, J., Yarmo, M.A., 2014. Recovery and purification of crude glycerol from vegetable oil transesterification. *Sep. Purif. Rev.* 44, 250–267.
- Wiltsee, G., 1999. Urban Waste Grease Resource Assessment (No. NREL/SR-570-26141). National Renewable Energy Lab, Golden, CO.
- Win, S.S., Hedge, S., Trabold, T.A., 2015. Techno-economic assessment of different pathways for utilizing glycerol derived from waste cooking oil-based biodiesel. Proceedings of the ASME Power and Energy Conversion Conference, Paper Power Energy 2015–49563, San Diego, CA, June 28–July 2.
- Yaakob, Z., Mohammad, M., Alherbawi, M., Alam, Z., Sopian, K., 2013. Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 18, 184–193.
- Yang, F., Hanna, M.A., Sun, R., 2013. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels* 5 (13), 1–10.