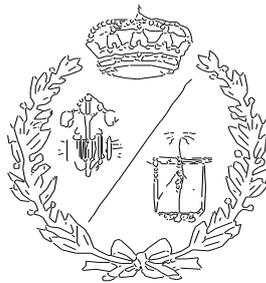


**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN**

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

**ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE ACEITE A
PARTIR DE RESIDUOS DE PESCADO PARA
LA FABRICACIÓN DE BIODIÉSEL EN
CANTABRIA
(STUDY ON THE EXTRACTION OF OIL FROM
FISH WASTE FOR BIODIESEL PRODUCTION IN
CANTABRIA)**

Para acceder al Título de

**GRADUADO EN INGENIERÍA EN
TECNOLOGÍAS INDUSTRIALES**

Autor: Álvaro Laya Musy

Septiembre - 2024

A Miguel y Marta, las personas que me dieron la vida.

A mi hermana, Ángela.

A mis increíbles abuelos, Sito y Viví.

Al mejor compañero de laboratorio posible, Yiorgos.

A la dedicación de mi tutor, Alberto.

Y al pilar y amor de mi vida, Blanca.

TÍTULO	Estudio de la obtención de aceite a partir de residuos de pescado para la fabricación de biodiésel en Cantabria		
AUTOR	Álvaro Laya Musy		
DIRECTOR	Alberto Coz Fernández		
TITULACIÓN	Grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales	FECHA	06/09/2024

PALABRAS CLAVE

Biodiésel; Aceite de pescado; Residuos de pescado; Extracción líquido-líquido;

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La dependencia de combustibles fósiles y sus consecuencias ambientales impulsan la búsqueda de alternativas sostenibles como el biodiésel, que puede reducir significativamente las emisiones de CO₂. El aceite derivado de desechos de pescado, tradicionalmente considerado un residuo de bajo valor, ofrece una opción prometedora para la producción de biodiésel, facilitando la gestión de residuos pesqueros y contribuyendo a una economía circular. El proyecto Sostén La Flota busca establecer métodos para producir biodiésel de alta calidad a partir de estos desechos, beneficiando a pequeñas regiones pesqueras al proporcionarles una fuente de energía sostenible y económica para sus buques y fábricas.

Este trabajo se centra en el proceso de extracción del aceite necesario para la fabricación de biodiésel, buscando la mejor opción en cada etapa a escala de laboratorio.

RESULTADOS

Para poner en marcha un método eficiente de extracción de aceite y asegurar que el biodiésel producido cumpla con las normativas vigentes, se han seguido una serie de pasos cruciales. Estos incluyen la investigación de métodos de extracción, el diseño de procesos específicos, la identificación de parámetros clave del aceite y la realización de experimentos detallados para garantizar la calidad del aceite extraído.

La cantidad total de aceite extraído tras una extracción líquido-líquido en los experimentos 1, 2 y 3, que se diferencian por el uso o no de cocción y el tipo de prensado, fue de 6,4736 g, 7,1006 g y 3,1342 g, respectivamente, mientras que el porcentaje de aceite extraído en relación con el peso total de cada muestra fue de 0,817%, 0,890% y 0,391%.

Los parámetros obtenidos de la caracterización de los 3 aceites fueron: densidad (0,88 g/ml, 0,928 g/ml y 0,82 g/ml), índice de acidez (1,2 mg NaOH/g, 1,7 mg NaOH/g y 1,1 mg NaOH/g), contenido de agua (0,3147%, 0,7799% y 0,6342%), índice de yodo (121, 110 y 38,3) y temperatura de inflamación (205°C para la muestra 2).

CONCLUSIONES

La extracción de aceite de bocarte a escala de laboratorio ha mostrado que el prensado automático es más eficiente que el manual. Además, la centrifugación directa no es adecuada; para obtener buenos resultados es necesaria una extracción líquido-líquido con hexano, debido a la presencia de proteínas y otras sustancias no solubles en el aceite.

El aceite muestra elevados índices de acidez y contenido de agua, lo que demanda la aplicación de métodos de refinamiento como clarificación, filtrado, secado o el uso de desecantes químicos. La esterificación ácida podría ser necesaria para mejorar su calidad.

La cocción previa del pescado puede disminuir la densidad del aceite y reducir el contenido en agua. El aceite extraído sin cocción, por su parte, cumple con el índice de yodo adecuado y se obtiene en mayor cantidad, pero presenta altos niveles de ácidos grasos libres, lo que requiere un mayor pretratamiento para evitar la formación de jabones durante la producción de biodiésel.

Para optimizar el proceso, se recomienda escalar la producción y evaluar la temperatura de inflamación del aceite, lo cual permitirá comprender mejor las ventajas de cada método. Así, la decisión sobre el método más adecuado podría dejar de basarse en una evaluación técnica y económica. Adicionalmente, se sugiere realizar una cromatografía de gases para obtener una caracterización más precisa del aceite.

BIBLIOGRAFÍA PRINCIPAL

- Bonilla-Mendez, J. R., & Hoyos-Concha, J. L. (2018). Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(3), 645–668.
- Chantachum, S., Benjakul, S., & Sriwirat, N. (2000). Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry*, 69(3), 289–294.

TITLE	Study on the extraction of oil from fish waste for biodiesel production in Cantabria		
AUTHOR	Álvaro Laya Musy		
DIRECTOR	Alberto Coz Fernández		
ACADEMIC TITLE	<i>Degree in Industrial Engineering</i>	DATE	06/09/2024

KEYWORDS

Biodiesel; Fish oil; Fish waste; Liquid-liquid extraction;

SCOPE

The reliance on fossil fuels and their environmental consequences drive the search for sustainable alternatives such as biodiesel, which can significantly reduce CO₂ emissions. Oil derived from fish waste, traditionally considered a low-value byproduct, presents a promising option for biodiesel production. It facilitates the management of fishery waste and supports a circular economy. The Sostén La Flota project aims to develop methods for producing high-quality biodiesel from these wastes, benefiting small fishing communities by providing them with a sustainable and cost-effective energy source for their vessels and factories.

This work focuses on the oil extraction process necessary for biodiesel production, seeking the best option at each stage on a laboratory scale.

RESULTS

To implement an efficient oil extraction method and ensure that the produced biodiesel meets current regulations, a series of crucial steps have been followed. These include researching extraction methods, designing specific processes, identifying key oil parameters, and conducting detailed experiments to ensure the quality of the extracted oil.

The total amount of oil extracted from liquid-liquid extraction in experiments 1, 2, and 3, which differed in terms of cooking and pressing methods, was 6.4736 g, 7.1006 g, and 3.1342 g, respectively. The percentage of oil extracted relative to the total weight of each sample was 0.817%, 0.890%, and 0.391%.

The parameters obtained from the characterization of the three oils were as follows: density (0.88 g/ml, 0.928 g/ml, and 0.82 g/ml), acid value (1.2 mg NaOH/g, 1.7 mg NaOH/g, and 1.1 mg NaOH/g), water content (0.3147%, 0.7799%, and 0.6342%), iodine value (121, 110, and 38.3), and flash point (205°C for sample 2).

CONCLUSIONS

Laboratory-scale extraction of anchovy oil has demonstrated that automatic pressing is more efficient than manual pressing. Furthermore, direct centrifugation is not suitable; effective results require a liquid-liquid extraction with hexane due to the presence of proteins and other substances that are not soluble in the oil.

The oil shows high levels of acidity and water content, which requires the use of refining methods such as clarification, filtration, drying, or chemical desiccants. Acid esterification may also be needed to improve its quality.

Pre-cooking the fish can decrease the oil's density and reduce its water content. Although oil extracted without pre-cooking meets the required iodine value and is obtained in greater quantities, it has higher levels of free fatty acids, which requires more extensive pre-treatment to prevent soap formation during biodiesel production.

To optimize the process, it is advisable to scale up production and assess the oil's flash point. This will help in understanding the benefits of each method, potentially shifting the decision away from being solely based on technical and economic considerations. Additionally, gas chromatography is recommended for a more accurate characterization of the oil.

MAIN REFERENCES

- Bonilla-Mendez, J. R., & Hoyos-Concha, J. L. (2018). Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Corpoica Ciencia y Tecnologia Agropecuaria*, 19(3), 645–668.
- Chantachum, S., Benjakul, S., & Sriwirat, N. (2000). Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry*, 69(3), 289–294.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	11
1.1 IMPORTANCIA DEL BIODIÉSEL	11
1.2 BIODIÉSEL A PARTIR DE DESECHOS	13
1.3 OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE RESIDUOS DE PESCADO	14
1.4 BIODIÉSEL EN CANTABRIA	16
1.5. OBJETIVOS	17
2 PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE	18
2.1 ETAPAS DEL PROCESO	21
2.1.1 Extracción	21
2.1.2 Refinación y purificación	23
2.1.3 Secado	26
2.2 PARÁMETROS CLAVE DEL ACEITE DE PESCADO PARA LA FABRICACIÓN DE BIODIÉSEL.....	26
2.2.1 Densidad.....	26
2.2.2 Viscosidad.....	26
2.2.3 Acidez en aceite.....	26
2.2.4 Índice de yodo.....	27
2.2.5 Contenido en agua	27
2.2.6 Inflamabilidad del aceite	27
3 PUESTA EN MARCHA DE UN PROCESO DE OBTENCIÓN DE ACEITE DE PESCADO A ESCALA DE LABORATORIO	28
3.1 DISEÑO Y PROCEDIMIENTO DEL PROCESO.....	28
3.1.1 Preparación	30
3.1.2 Cocción.....	30
3.1.3 Pre-estruje	31
3.1.4 Prensado húmedo	31

3.1.5 Extracción líquido-líquido.....	33
3.1.6 Centrifugado	33
3.1.7 Evaporación y secado.....	35
3.2 EXPERIMENTOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS	35
3.2.1 Diseño de experimentos	35
3.2.2 Análisis de los parámetros clave	36
3.3 RESULTADOS	52
3.3.1 Realización de experimentos y resultados	52
3.3.2 Discusión de los análisis clave	80
4 CONCLUSIONES	98
5 BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXO 1 - BASE DE DATOS SOBRE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE PARA BIODIÉSEL.....	105
ANEXO 2 – DISEÑO INICIAL DE EXPERIMENTOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación emisiones diésel y biodiésel (Dwivedi et al., 2006)	11
Figura 2. Gráfico de buques activos en Cantabria en junio de 2024 (Ministerio de agricultura, 2024).....	17
Figura 3. Diagrama del proceso.....	29
Figura 4. Gráfica de datos de titración de la primera muestra de aceite	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Otros procesos de purificación (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018)	25
Tabla 2. Tabla de experimentos del enfoque seguido	36
Tabla 3. Datos de la preparación de experimentos	53
Tabla 4. Temperatura de cocción cada 5 minutos	56
Tabla 5. Resumen de las cantidades utilizadas y desechadas en cada experimento	68
Tabla 6. Peso de las muestras de aceite y de crudo tras el segundo centrifugado.....	70
Tabla 7. Cantidad de aceite extraído a partir de la cantidad tomada de cada muestra.....	77
Tabla 8. Cantidades finales de aceite extraído y porcentajes de extracción	79
Tabla 9. Medidas de densidad de las diferentes muestras.....	81
Tabla 10. Resultados del análisis de acidez en las muestras	90
Tabla 11. Contenido en agua de las muestras	91
Tabla 12. Índice de yodo de cada muestra de aceite	96

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Prensa de doble tornillo (Haarslev, n.d.)	22
Ilustración 2. Tanque de decantación (Oil Skimmers, n.d.)	23
Ilustración 3. Centrifugadora decantadora (Flottweg, n.d.).....	24
Ilustración 4. Vaporera de la marca Russell Hobbs (Russell Hobbs, n.d.)	30
Ilustración 5. Licuadora de la marca Cecotec (Cecotec, n.d.)	32
Ilustración 6. Prensa automática para aceite (Amazon, n.d.-a).....	32
Ilustración 7. Prensa manual (Amazon, n.d.-b).....	33
Ilustración 8. Centrifugadora de la marca Orto Alresa (Orto Alresa, n.d.)	34
Ilustración 9. Estufa de la marca JP Selecta (SELECTA sau, n.d.).....	35
Ilustración 10. Líquido de cocción del experimento 0	54
Ilustración 11. Muestra de pescado cocida.....	54
Ilustración 12. Pasta de prensado	55

Ilustración 13. Líquido de cocción del experimento 1	57
Ilustración 14. Muestra troceada del experimento 1	57
Ilustración 15. Líquido de prensado del experimento 1	58
Ilustración 16. A la izquierda, los desechos prensados; a la derecha, la pasta restante	58
Ilustración 17. Arriba, las muestras de cocción, abajo las de prensado, ambas antes y después del centrifugado	59
Ilustración 18. Aceite extraído del líquido de prensado	60
Ilustración 19. Secado y muestra.....	60
Ilustración 20. Enfriado y muestra final.....	61
Ilustración 21. Líquido de prensado del experimento 2	62
Ilustración 22. Arriba, el líquido sin centrifugar; abajo, centrifugado	63
Ilustración 23. Aceite extraído del experimento 2	63
Ilustración 24. Muestra 2 antes y después del enfriado.....	64
Ilustración 25. Líquido de cocción del experimento 3	64
Ilustración 26. Líquido de prensado y desechos del experimento 3	65
Ilustración 27. Arriba, el líquido de cocción antes y después del centrifugado; abajo, el de prensado centrifugado	66
Ilustración 28. Aceite extraído del experimento 3	66
Ilustración 29. Aceite 3 antes y después del enfriado.....	67
Ilustración 30. Introduciendo la capa superior en viales de 2 ml	70
Ilustración 31. Muestras de aceite, en los viales, y de crudo, en los Falcon	71
Ilustración 32. Muestra cercana a pH 4	72
Ilustración 33. A la izquierda, la mezcla con supuestas proteínas; a la derecha, solo la mezcla	73
Ilustración 34. Arriba, la mezcla con la solución de 0,01 ml; abajo, con la de 0,1 ml	74
Ilustración 35. Arriba, la muestra antes de cada centrifugado; abajo, el aceite antes y después del evaporado	75
Ilustración 36. A la izquierda, la muestra 1; a la derecha, la muestra 3	76
Ilustración 37. Las tres muestras de líquido impuro mezcladas con hexano, después del centrifugado	78
Ilustración 38. Densidad de la muestra de aceite número 2.....	81
Ilustración 39. Muestra tomada de NaOH.....	82
Ilustración 40. NaOH disolviéndose en un agitador magnético	83
Ilustración 41. Mezcla de disolventes y fenolftaleína preparada debajo de la bureta.....	83
Ilustración 42. Mezcla durante y después de la titulación.....	84
Ilustración 43. Mezcla tras la titulación	85

Ilustración 44. Muestra estable	86
Ilustración 45. Muestra de aceite 1 tras la titulación	87
Ilustración 46. Muestra de aceite 2 tras la titulación	88
Ilustración 47. Muestra de aceite 3 tras la titulación	89
Ilustración 48. Arriba, la mezcla antes del reposo de 1h; abajo, después	94
Ilustración 49. Las muestras antes, durante y después de la titulación (de arriba abajo: blanco y muestras 1, 2 y 3)	95
Ilustración 50. Determinación del punto de inflamación	97

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 IMPORTANCIA DEL BIODIÉSEL

Se prevé que la energía total demandada en el mundo incremente un 28% para el año 2040, por lo que es de interés el estudio de fuentes de energía renovables, como los biocombustibles (Alvarado-Ramírez et al., 2022). Esta alternativa frente a los combustibles fósiles permite una mayor flexibilidad de producción, ya que cuenta con varias fuentes versátiles y renovables. La principal es una materia orgánica llamada biomasa, que puede provenir de distintos medios, como plantas, estiércol, desechos agrícolas, aguas residuales, etc.

El biodiésel, por su parte, puede obtenerse a partir de biomasa vegetal o animal, a diferencia de los combustibles fósiles utilizados por el diésel convencional. Se trata de un combustible biodegradable y renovable que, además de poderse utilizar en motores como sustitutivo del diésel sin modificaciones significativas, es menos contaminante. Esto implica un menor impacto medioambiental, tanto por la emisión de gases de efecto invernadero, como por la dependencia y el impacto paisajístico derivado de la extracción del petróleo (del Portillo Valdés et al., 2011). La Figura 1 muestra la comparación de las emisiones de partículas de biodiésel frente al diésel (Dwivedi et al., 2006).

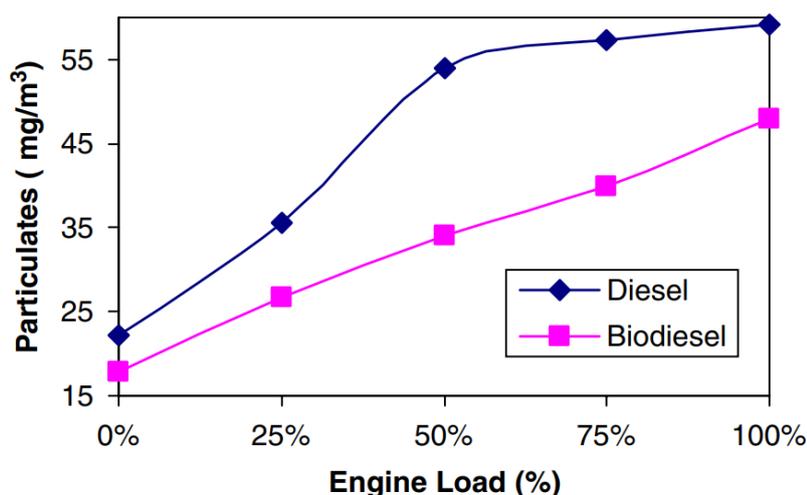


Figura 1. Comparación emisiones diésel y biodiésel (Dwivedi et al., 2006)

El biodiésel, por lo tanto, se posiciona como una considerable y real alternativa para la reducción de emisiones y plantea la posibilidad de dar una segunda vida a las materias primas, alcanzando así una deseada economía circular. En comparación con otros tipos de biocombustibles como pueden ser el biogás, el biometano o el biohidrógeno, el biodiésel resulta de mayor interés para la descarbonización del sector del transporte pesado y surge como uno de los pilares esenciales para lograr el objetivo de cero emisiones en 2050 fijado por el Acuerdo de París de las Naciones Unidas (Unfccc, 2015). Una de las razones se debe a que, a pesar de que su producción se haya probado, principalmente, a nivel comercial, se ha concluido que el tamaño de la planta no supone un límite, lo que beneficia y hace partícipe a pequeñas regiones pudiendo aumentar proporcionalmente su planta en función de la materia prima local disponible. Sin embargo, el uso del biodiésel conlleva una serie de problemas, como la baja estabilidad de oxidación, las malas propiedades de flujo en frío o el bajo contenido en energía (Alvarado-Ramírez et al., 2022).

Una de las soluciones más utilizadas hoy en día consiste en mezclar el biodiésel con diésel convencional, de manera que las propiedades del combustible fósil no se ven altamente alteradas y ayuda a dar un paso hacia un futuro más sostenible. La ventaja que presentan estos combustibles al no requerir modificaciones en los motores hace que las mezclas con contenidos en biodiésel del 10% (B10) y del 20% (B20) sean opciones cada vez más disponibles en las gasolineras (Vipe Fuels, 2024). Existe un interés visible en reducir la cantidad de diésel utilizado en estas mezclas debido a sus ventajas medioambientales. Sin embargo, esta reducción supone una serie de problemas que cuestionan su viabilidad. En el caso extremo de los combustibles B100 (100% biodiésel), su utilización, desde el punto de vista mecánico, requiere realizar modificaciones en los motores debido a su elevado poder disolvente (FITSA & IDAE, 2008). Pese a que la mayoría de los motores actuales en la automoción han sustituido sus componentes de goma por materiales plásticos, aún puede llegar a ser un problema para los sistemas de alimentación y filtrado, presentando así la necesidad de un mayor mantenimiento. El biodiésel, además, tiene una menor fluidez en frío y se congela a bajas temperaturas, lo que puede suponer un problema a la hora de arrancar el motor. Por otro lado, desde el punto de vista energético, su poder calorífico es menor que el del diésel, ofreciendo un menor rendimiento o un consumo más alto. Finalmente, atendiendo al aspecto económico, el B100, en ocasiones, supone un

mayor coste que el propio diésel. Todas estas desventajas dejan claro que, hoy en día, la opción más viable sigue siendo la mezcla del biodiésel con combustibles fósiles.

1.2 BIODIÉSEL A PARTIR DE DESECHOS

El biodiésel está ganando relevancia, especialmente el obtenido a partir de biomasa vegetal. Sin embargo, se están explorando otras opciones más interesantes desde el punto de vista del aprovechamiento de desechos, como los marinos. Aunque la utilización de microalgas y pasto marino es una opción más común para la obtención de biodiésel, el desperdicio de alimentos y descartes del pescado supone un gran impacto ambiental y económico (Alvarado-Ramírez et al., 2022). En la Unión Europea, la industria pesquera produce un total de 5,2 millones de toneladas de residuos por año (RETEMA, 2021). Sin embargo, este número es aún mayor en Asia, donde se encuentran 6 de los 10 países con mayor producción de desechos, siendo Vietnam el tercer mayor productor acuícola del mundo. Se trata de un país que sufre muchos cortes eléctricos, por lo que necesitan nuevas alternativas energéticas. Con la ayuda del proyecto ENERFISH de la Unión Europea, una planta al sur de Vietnam se dedica a la obtención de biodiesel a partir de residuos de la industria pesquera, con el objetivo de generar 150 MWh a partir de 13 toneladas de biodiésel obtenido de 81 toneladas de residuos (Bohlmann & Salinas, 2013). Teniendo en cuenta que las dimensiones de la planta son pequeñas en comparación con la cantidad de residuos que se procesan, este método resulta bastante eficiente y no presenta demasiadas limitaciones de espacio.

Afortunadamente, Vietnam no es el único país que ha implementado la obtención de biodiésel a partir de los desechos de pescado. Otros países, como Brasil o Finlandia, han utilizado métodos más efectivos para obtener una mayor cantidad de litros por kilogramo de residuo, hasta una relación cercana al 1:1 (Tobalina, 2013). Además, la aparición de nuevas aplicaciones supone un mayor abanico de posibilidades, más allá de la utilización del biodiésel para el propio abastecimiento de la planta. En el caso del país nórdico, por ejemplo, se utiliza como una alternativa al diésel utilizado en el transporte público (Nordregio, n.d.).

Por lo tanto, la utilización de desechos de pescado para la obtención de biodiésel tiene como finalidad fomentar una economía circular sostenible, utilizando la energía que proporciona este biocombustible para abastecer todas las etapas del proceso, abaratando así los costes y reduciendo las emisiones. Además, de esta manera, se aprovechan restos de alimentos y descartes que, de otra manera, acabarían en vertederos. Esta nueva vida de los restos de pescado resulta muy útil para pequeñas regiones de carácter pesquero, ya que, el biodiésel obtenido, aparte de dar lugar a fábricas autosuficientes que no requieren la ayuda de energías fósiles, puede utilizarse como combustible para sus buques pesqueros. Así mismo, en caso de haber suficiente producción, también puede venderse o llegar a utilizarse para el transporte público local. Por otro lado, se presenta otra ventaja económica en los distintos compuestos obtenidos a lo largo de las etapas del proceso, ya que no siempre son necesarios para la obtención del biodiésel. Estos compuestos o productos, como es el caso del glicerol, pueden ser de interés en otro tipo de industrias, como la cosmética (Tobalina, 2013).

1.3 OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE RESIDUOS DE PESCADO

Una de las biomásas más utilizadas para obtener biodiésel es la vegetal, pero existen otras opciones que también son beneficiosas a nivel económico y medioambiental. En los últimos años, se han llevado a cabo muchos estudios enfocados a las ventajas que ofrecen la flora y fauna marina. Se ha centrado la mayor parte de la atención en las algas, ya que absorben 183 gigatoneladas de CO₂ al tiempo que generan 100 gigatoneladas de biomasa, lo que resulta muy eficaz y sostenible (Alvarado-Ramírez et al., 2022). Pero también se han estado explorando los beneficios que presenta el pescado, ya que sus residuos suponen millones de toneladas contaminantes que han de ser procesadas en vertederos. De esta manera, pueden ser reutilizados, contribuyendo al ahorro económico y ayudando a combatir las emisiones del diésel convencional, reafirmando, así, la idea de que la opción más viable para lograr una economía circular a nivel global y, por lo tanto, también a nivel regional, reside en la producción de biodiésel.

Las características fisicoquímicas del aceite empleado como materia prima en el proceso de obtención de biodiésel son imprescindibles para obtener un

biocombustible de alta calidad que cumpla con los requisitos legales establecidos. Por eso, cuando el punto de partida es la biomasa tanto de origen animal o vegetal, como la proveniente de restos o productos alimentarios, el primer paso consiste siempre en una correcta **extracción del aceite**. La extracción a partir de desechos agrícolas es compleja y no produce la cantidad necesaria para satisfacer toda la demanda energética. Los residuos de pescado y de algas, por otro lado, son una alternativa de bajo coste que se presenta de manera abundante y que puede convertirse en biodiésel con facilidad, pudiendo ofrecer opciones de producción más sencillas, económicas y con un menor impacto medioambiental.

Como se expondrá más adelante, para fabricar biodiésel interesan los restos de pescados grasos (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018), a través de los cuales, tras una serie de procesos, se obtiene el aceite que se transformará para dar lugar al biodiésel. Resulta esencial conseguir una alta pureza en el aceite. Por eso, en ocasiones, existen procesos adicionales para lograr una mayor pureza o potenciar propiedades de interés. Sin embargo, no siempre son relevantes a la hora de producir biodiésel, puesto que deben tenerse en cuenta otros factores como la financiación, el equipo utilizado, los tiempos de procesado o la mano de obra.

Una vez obtenido un aceite purificado de calidad, se procede a la reacción de **transesterificación**, donde se transforma en biodiésel. Estos aceites, que son triglicéridos compuestos por tres cadenas de ácidos grasos unidos por una molécula de glicerina, reaccionan con alcoholes de bajo peso molecular, como el metanol, con la ayuda de un catalizador, como puede ser la lejía (Agencia Sinc, 2020). Esta reacción a temperatura constante, a la que se le suma una etapa de decantación o centrifugación, convierte dichos triglicéridos en biodiésel. Durante el proceso, se ha comprobado que la catálisis heterogénea, basada en el óxido alcalinotérreo, es más ventajosa frente a la homogénea, ya que no requiere una alta demanda energética ni necesita reciclar un gran volumen de alcohol para la purificación del biodiésel (Alvarado-Ramírez et al., 2022). El rendimiento obtenido es similar y, además, permite reutilizar el catalizador durante un alto volumen de ciclos. En ocasiones, el catalizador enzimático se utiliza como alternativa al óxido alcalinotérreo, ya que es capaz de conseguir un biodiésel muy puro y tiene la capacidad de abaratar el coste de producción. Sin embargo, presenta una lenta velocidad de reacción y el elevado coste del catalizador solo lo hace rentable económicamente en la producción a larga escala.

En el año 2020, se publicó un artículo en el que científicos de la Universidad de Córdoba (España) habían logrado fabricar un biodiésel de menor coste energético y más sostenible a partir de los ácidos grasos provenientes de los desperdicios alimentarios de restaurantes (Agencia Sinc, 2020), lo que podría ser extrapolable a los desechos que se obtienen del pescado no procesado. Este ahorro se debía al uso de ultrasonido durante la transesterificación, reduciendo el tiempo de transformación de 1 hora a 20 minutos (Carmona-Cabello et al., 2019). Sin embargo, aunque la transesterificación con ultrasonidos reduzca significativamente el consumo energético, requiere una mayor cantidad de catalizador, que suele ser altamente contaminante, lo que hace que esta técnica no sea aún rentable.

1.4 BIODIÉSEL EN CANTABRIA

El proyecto Sostén La Flota, financiado por la Comunidad Autónoma de Cantabria y por la Unión Europea con fondos Next GenerationEU/PRTR, tiene como principal objetivo la mejora de la sostenibilidad de la flota pesquera y de los servicios portuarios de Cantabria y su propulsión mediante el uso de residuos provenientes de los descartes de pescado y de la proliferación de macroalgas. **El presente trabajo de final de grado** está contenido en la primera parte del proyecto, que consiste en la obtención de biodiesel a partir de residuos marinos para su aprovechamiento en buques pesqueros.

La flota pesquera de Cantabria cuenta con 127 buques activos (Ministerio de agricultura, 2024). La excelente ubicación geográfica de esta Comunidad Autónoma en la costa del Mar Cantábrico supone un gran impacto económico y cultural para la región, debido a sus conexiones comerciales, el transporte de mercancías y la industria marítima. Por esta misma razón, Cantabria cuenta con varias instalaciones portuarias, ubicadas en las localidades de Santander, Suances, Santoña, Castro-Urdiales, San Vicente de la Barquera, Comillas, Laredo y Colindres. Como se muestra en la Figura 1Figura 2, el puerto de Santoña es el que alberga una mayor cantidad de buques, debido a su larga historia de construcción naval y de industria pesquera (Javier et al., n.d.).

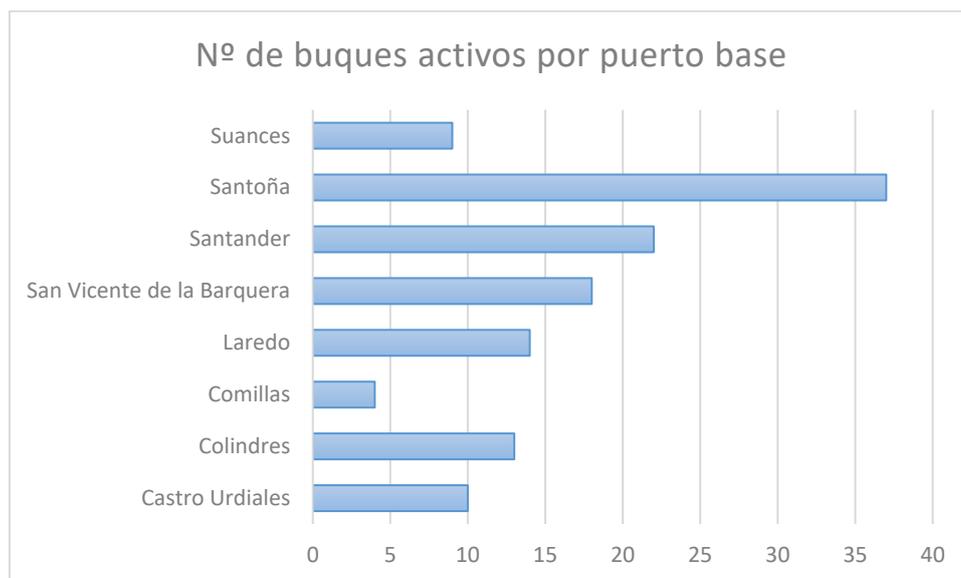


Figura 2. Gráfico de buques activos en Cantabria en junio de 2024 (Ministerio de agricultura, 2024)

Esto sitúa a Cantabria como la décima comunidad con mayor número de buques activos, por detrás de Galicia, Andalucía, Canarias, Cataluña, Comunidad Valenciana, Islas Baleares, Asturias, País Vasco y Murcia.

En el sector marítimo, el aumento de los precios del diésel ha afectado significativamente al sector pesquero, tanto económicamente como en términos de emisiones contaminantes (Gobierno de Cantabria, 2022). El uso de biodiésel podría mitigar este impacto, ya que posee las mismas propiedades funcionales que el diésel tradicional y mejora la lubricación del motor, prolongando su vida útil. La adopción de biodiésel, ya viable en otras regiones, representa una transición factible hacia combustibles más sostenibles y eficientes para la flota pesquera en Cantabria (Javier et al., n.d.).

1.5. OBJETIVOS

El objetivo del proyecto Sostén La Flota es sentar las bases para la obtención de biodiésel de alta calidad a partir de desechos de pescado, que pueda ser utilizado, al menos, a escala reducida. Esto permitirá a las pequeñas regiones pesqueras aprovechar los desechos generados por la industria para reabastecer energéticamente sus buques o fábricas y, al mismo tiempo, ayudar a reducir las emisiones, con el fin de lograr una economía circular.

Esto se consigue mediante una serie de pasos que deben ser cuidadosamente ejecutados. El primero, y en el que se centra este trabajo, consiste en el **proceso de extracción del aceite** necesario para la producción de biodiésel. Este proyecto es la continuación del TFG “Puesta a punto de un método de obtención de biodiésel a partir de aceite de desechos de pescado” en el cual se producía biodiésel a partir de un aceite obtenido de desechos de pescado procedente de la industria pesquera (Álvarez García, 2023). Sin embargo, en este TFG, se pretende obtener ese aceite a escala de laboratorio para poder poner a punto todo el proceso, desde su obtención (este TFG) hasta la obtención del biodiésel a partir de él (anterior TFG).

Para conseguir un aceite libre de impurezas y acorde con la normativa, se estudian las diferentes etapas del proceso, así como los distintos tipos de aceite y las condiciones óptimas para su obtención. Para cumplir este objetivo, se han llevado a cabo las siguientes etapas:

1. Búsqueda de métodos para la obtención de aceite de pescado y análisis de las etapas involucradas en dicho proceso.
2. Selección y diseño de un proceso de obtención de aceite de pescado a escala de laboratorio para la posterior obtención de biodiésel.
3. Identificación y selección de los parámetros clave del aceite de pescado para su posterior utilización en la producción de biodiésel.
4. Diseño y ejecución de experimentos para la obtención de aceite de pescado y su posterior análisis.
5. Discusión de los resultados obtenidos y de la realización final del proceso propuesto.

2 PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE

Con el fin de obtener un biodiésel de una calidad aceptable y de acuerdo con la normativa europea, resulta imprescindible un estudio meticuloso sobre la extracción del aceite de pescado, ya que es la primera fase del proceso y, por tanto, la base. Se deben tener en cuenta varios parámetros, entre los que se encuentran el tipo de

pescado utilizado, la maquinaria necesaria para llevar a cabo el proceso o los tiempos y temperaturas empleadas en cada fase.

Como se ha mencionado anteriormente, para la obtención del biodiésel son necesarios pescados con un alto contenido en lípidos, ya que permiten obtener un mejor rendimiento en la extracción del aceite, consiguiendo así una mayor cantidad de aceite por unidad de peso de pescado utilizado. Además, el alto contenido en lípidos favorece también a la calidad del biodiésel, aumentando la cantidad de ácidos grasos que pueden ser convertidos en ésteres metílicos durante la transesterificación (Babderra et al., 2016).

Estos pescados ricos en lípidos presentan una elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 de cadena larga, como los ácidos eicosapentaeónico (EPA) y docosahexaeónico (DHA) (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018). Por lo general, los estudios que se han realizado hasta ahora se han centrado, principalmente, en la extracción de aceite para su uso en los campos de la nutrición y de la salud debido a sus propiedades profilácticas y terapéuticas. El aceite de pescado, por su lado, surgía como un producto secundario de la obtención de harina de pescado para alimentación animal, hasta que tomó relevancia al ser la principal fuente de estos ácidos grasos (Valenzuela B. et al., 2012). Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación, siendo perjudicial para el biodiésel (Pullen & Saeed, 2014). La baja estabilidad oxidativa aumenta la viscosidad y da lugar a sustancias insolubles que pueden provocar obturaciones en bombas y tuberías (Interempresas, 2015). En ocasiones, su corrección es necesaria, ya que la estabilidad oxidativa, así como otras propiedades, son necesarias para que el biodiésel pueda ser empleado como combustible, según recoge la norma europea EN 14214 (UNE, 2018b). A menudo, se utilizan soluciones como la adición de antioxidantes o la utilización de aceites vegetales estables como el aceite de palma o de fritura. En 2015, científicos del grupo de Biorreactores BIO-110 de la Universidad de Granada (España) en colaboración con la Universidad de Campinas (Brasil) obtuvieron un biodiésel más efectivo al mezclar aceite de pescado (42,1%) con aceite de fritura (57,9%), seguido de un proceso que constaba de dos etapas: la esterificación ácida y la transesterificación básica (Rico, 2015). El resultado final presentaba un biodiésel con una mayor resistencia a la oxidación sin ser demasiado perjudicial a sus propiedades en frío.

No obstante, la elección de un pescado con alto contenido en lípidos no siempre resulta en un aceite con baja estabilidad frente a la oxidación (Pullen & Saeed, 2014). Pese a tener un mayor número de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con otros pescados, una proporción equilibrada de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados puede suponer una mayor estabilidad oxidativa. Además, esta susceptibilidad puede ser contrarrestada por la presencia de antioxidantes naturales en el pescado, así como otros componentes con propiedades antioxidantes, como los fosfolípidos y las proteínas. Los pescados azules, como el bocarte, representan una opción viable para obtener biodiésel con buena estabilidad oxidativa.

Por otro lado, existe otro grupo de ácidos perjudicial para la obtención de biodiésel: los ácidos grasos libres (FFA). En este caso, es necesario eliminarlos, ya que pueden aumentar la acidez del aceite, lo que supone un riesgo de corrosión para los equipos. Además, pueden causar reacciones no deseadas, formando jabones antes de que se formen los ésteres metílicos deseados (Babderra et al., 2016).

Existen dos procesos principales en la extracción del aceite: (i) por un lado, la materia prima, a partir de la cual se obtiene el aceite, es sometida a un proceso de extracción que da lugar a tres facciones mayoritarias: sólidos, aceite y agua; y, (ii) por otro lado, con el fin de lograr un aceite libre de impurezas, es necesario un posterior proceso de purificación. Ambos procesos cuentan con varias etapas que, a su vez, se pueden llevar a cabo mediante diferentes técnicas, siendo algunas de ellas alternativas menos rentables a las comúnmente utilizadas y, otras, simplemente complementarias.

Algunos estudios han revelado que las tecnologías basadas en fluido supercrítico o asistidas por microondas son las más apropiadas para la extracción del aceite, gracias a la alta eficiencia de conversión, bajo coste y alta sostenibilidad (Alvarado-Ramírez et al., 2022). Lamentablemente, solo está demostrado a escala industrial. Implementarlo en pequeñas regiones pesqueras para reabastecerse a partir de los desechos que generan supone una inversión inversamente proporcional que no resulta tan rentable.

2.1 ETAPAS DEL PROCESO

2.1.1 Extracción

El método más utilizado para la extracción a escala industrial es el prensado húmedo de los restos de pescado (cabezas, espinas, vísceras, etc.). Existen otros métodos como la extracción mediante solventes (Moffat et al., 1993), por fluidos supercríticos (Dunford et al., 2006) y por ensilaje químico o enzimático. Sin embargo, no son tan buenas opciones como el prensado. El primero se caracteriza por ser destructivo y emplear mucho tiempo, el segundo destaca por ser novedoso pero caro a nivel industrial y, el tercero, a pesar de ser simple y económico, no es tan efectivo como el prensado (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018). Además, dado el carácter local en el que se centra este trabajo, se ha decidido que la mejor opción es la cocción y posterior prensado.

Cocción

La cocción previa al prensado es necesaria, ya que ayuda a coagular la proteína para que los componentes líquidos se puedan separar de los sólidos con mayor facilidad. Adicionalmente, permite la rotura de células, facilitando que las grasas liberen aceite a la fase líquida. Sin embargo, como refleja un estudio realizado en la Universidad Príncipe de Songkla, en Tailandia, las proteínas sufren una irreversible desnaturalización al ser calentadas por encima de los 90°C durante un largo periodo de tiempo, dando lugar a una estructura proteica muy compacta que dificultaba la separación de las fases. Por eso, resultaba mucho más efectivo alargar el tiempo de cocción para una temperatura inferior. Las condiciones óptimas para lograr la separación del aceite se consiguieron calentando una muestra a 85°C durante 30 minutos, seguido de un prensado de 140 ton/m² (Chantachum, Benjakul, and Sriwirat 2000).

En ocasiones, en las plantas de procesado, para la limpieza de ciertos pescados se realiza un precocido, como ocurre, por ejemplo, con el atún. Por eso, muchos de los restos de pescado que se utilizan para extraer aceite ya están previamente cocinados. Sin embargo, este último estudio demostró que el aceite extraído a partir de cabezas de atún era de mayor calidad y más eficiente en muestras sin dicho precocinado.

Por otro lado, la etapa de cocción resulta esencial para la eliminación de ácidos grasos libres (FFA). El interés en deshacerse del mayor número posible de estos ácidos supone uno de los principales factores para determinar las condiciones óptimas de cocción. Se ha visto que, el contenido en FFA para su fácil separación, es más bajo al calentar el aceite a temperaturas inferiores a los 75°C y tiempos por debajo de los 30 minutos, ya que ocurre una menor hidrólisis de los enlaces de éster de los triglicéridos.

La manera más común para cocer la materia prima es mediante vapor, utilizando, por ejemplo, una vaporera. Esto se debe a que la cocción con vapor indirecto es más beneficiosa que la cocción con vapor directo, ya que esta última incorpora agua adicional que habría que eliminar en etapas posteriores del proceso (Ortiz, 2023).

Prensado

Los desechos de pescado se introducen en una prensa que, mediante presión y temperatura, devuelve una mezcla pastosa de aceite, agua y componentes sólidos. Pueden presentarse reacciones de degradación como la hidrólisis o la oxidación que, debido a condiciones drásticas de presión y temperatura durante el proceso de coagulación de proteínas, dan lugar a posibles cambios en los AGPI. En la Ilustración 1 se muestra una prensa de doble tornillo, que está compuesta por dos tornillos de giro contrario que se ensamblan, contenidos en la carcasa de un escurridor y rodeados por una cubierta (Haarslev, n.d.).

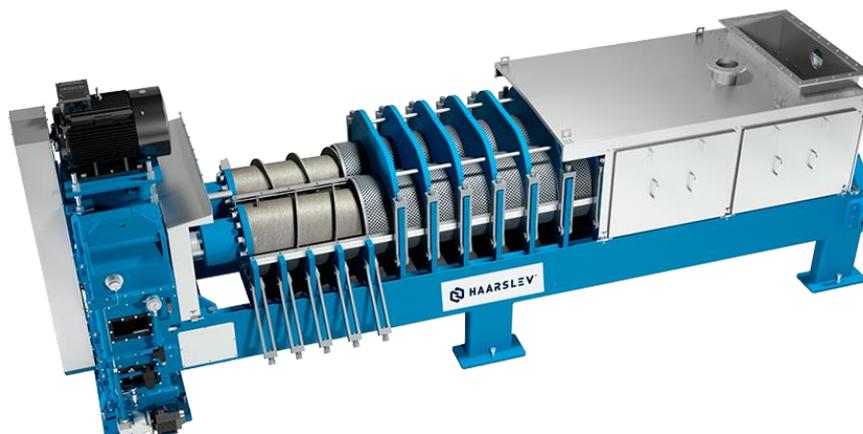


Ilustración 1. Prensa de doble tornillo (Haarslev, n.d.)

2.1.2 Refinación y purificación

Una vez realizada la extracción, para eliminar cualquier contenido sólido o acuoso presente en el aceite, es necesaria una fase de refinación. Destacan dos procesos por encima del resto, la decantación y la centrifugación. En ocasiones se combinan, pero, por lo general, la centrifugación es el más rápido y eficiente (Solen & Harb, 2011).

Decantación

Consiste en la separación del aceite de los restos acuosos y sólidos mediante el reposo, de manera que los últimos quedan en el fondo del tanque. El aceite y el agua, por su parte, quedan en la superficie y son extraídos lentamente mediante válvulas y otros dispositivos de control de flujo, como se aprecia en la Ilustración 2.

El aceite se almacena en tanques de decantación o sedimentación. Pueden ser circulares o rectangulares, evitando así turbulencias. Constan de sistemas de recolección y tuberías en la parte superior del tanque para la extracción de la capa superior (Towler et al., 2008).

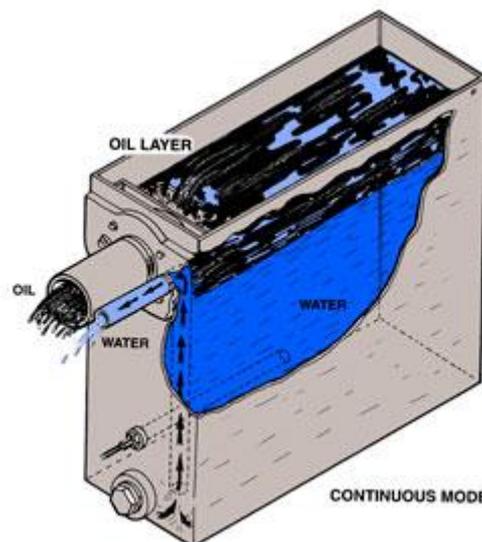


Ilustración 2. Tanque de decantación (Oil Skimmers, n.d.)

Centrifugación

La centrifugación, a diferencia de la decantación, consigue separar también partículas pequeñas. Por ello, a la hora de extraer el aceite para la obtención de biodiésel, es

un método de mayor interés que la decantación, ya que se obtiene un aceite más puro en menor tiempo.

Existen diferentes tipos de centrifugadoras o centrifugas utilizadas a escala industrial, como la horizontal de tres fases, la tubular o la de disco, entre otras. Como el funcionamiento de todas ellas está basado en la rotación a alta velocidad del tambor y es similar, su elección depende de factores como el espacio disponible o la distribución en planta.

En la centrifugadora horizontal de tres fases, que se muestra en la Ilustración 3, se logra una separación más completa de los componentes. La mezcla se introduce por el sistema de alimentación al tambor, donde gira horizontalmente a gran velocidad. Esta rotación logra la separación de los componentes de la mezcla según sus densidades. La fase más densa, compuesta por agua y sólidos, forma una especie de pasta o sedimento que se deposita en el extremo exterior del tambor. La fase menos densa, el aceite, se desplaza al centro del tambor, quedando una fase intermedia compuesta por agua y aceite entre ambas fases. Finalmente, se retiran todas las fases de la centrifuga. Actualmente, la mayoría de las centrifugadoras cuentan con sistemas de control avanzados que permiten ajustar distintos parámetros, como la velocidad de giro o el tiempo de residencia de las fases.

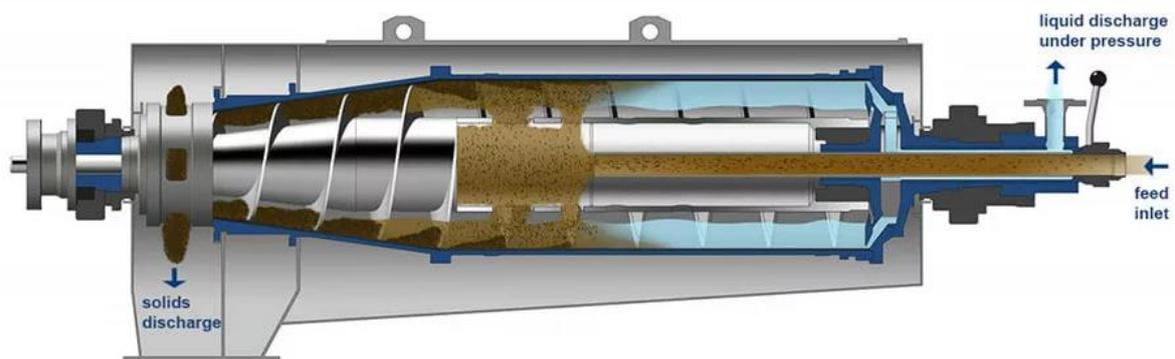


Ilustración 3. Centrifugadora decantadora (Flottweg, n.d.)

Otros procesos de purificación

Adicionalmente, existen procesos complementarios interesantes, que no son necesariamente imprescindibles, pero pueden ayudar a purificar y mejorar las características del aceite obtenido (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018). Lamentablemente, estos procesos están mayormente asociados a la extracción del aceite para fines nutricionales. Ciertos procesos sufren una mayor exposición a altas temperaturas, lo que incrementa la susceptibilidad a la oxidación, siendo perjudicial para el biodiésel. Algunos de estos procesos se detallan a en la Tabla 1.

Tabla 1. Otros procesos de purificación (Bonilla-Mendez & Hoyos-Concha, 2018)

Blanqueo	El aceite se trata con arcillas o carbón activado para adsorber y eliminar impurezas.
Desodorización	La desodorización se utiliza, principalmente, para eliminar los malos olores del aceite. Sin embargo, debido a que se realiza aplicando calor al aceite bajo vacío, también ayuda a eliminar compuestos volátiles.
Extracción líquido-líquido	En ocasiones, se requiere la utilización de líquidos específicos que facilitan la separación de las fases. Por ejemplo, para separar la proteína del aceite se utiliza agua, mientras que para extraer el aceite se utiliza hexano.
Neutralización	Añadiendo una solución alcalina, como hidróxido de sodio, se neutralizan los ácidos grasos libres presentes en el aceite, convirtiéndolos en jabones fáciles de extraer por centrifugación o decantación. Resulta imprescindible separar estos jabones del aceite, ya que dificultan la separación en etapas posteriores.
Filtración final	Si, tras haber realizado varios de los pasos anteriores durante el proceso de refinado se necesita una mayor pureza del aceite, se pueden utilizar membranas, filtros de celulosa o de fibras sintéticas.

2.1.3 Secado

Por último, el aceite libre de impurezas se somete a un proceso de secado para tratar de eliminar por completo la concentración de agua presente. Al igual que durante la cocción, una de las maneras más comunes para conseguirlo, en este caso, es mediante vapor. Sin embargo, existen otros métodos igual de efectivos como la utilización de estufas.

2.2 PARÁMETROS CLAVE DEL ACEITE DE PESCADO PARA LA FABRICACIÓN DE BIODIÉSEL

Con el fin de determinar la calidad del aceite obtenido para fabricar biodiésel, cumpliendo con la normativa de análisis, se llevan a cabo las mediciones de los siguientes parámetros.

2.2.1 Densidad

La densidad del aceite es un indicador de su composición y pureza. Afecta directamente a la conversión a biodiésel y a la eficiencia del proceso de transesterificación. Un aceite con densidad inadecuada puede llevar a la producción de biodiésel fuera de especificaciones. Según la norma EN 14214, la densidad del biodiésel debe estar dentro de un rango específico (entre 860 y 900 kg/m³ a 15°C) para garantizar su compatibilidad con los motores diésel estándar (UNE, 2018a).

2.2.2 Viscosidad

La viscosidad del aceite crudo es un factor importante en el proceso de transesterificación. Una alta viscosidad puede dificultar la mezcla del aceite con el metanol o etanol y el catalizador, afectando la eficiencia del proceso y la calidad del biodiésel producido (Alvarado-Ramírez et al., 2022). También es indicativa de la presencia de lípidos más complejos que pueden requerir un pretratamiento. La norma EN 14214 especifica que la viscosidad cinemática del biodiésel debe estar entre 3.5 y 5.0 mm²/s a 40°C (UNE, 2018a).

2.2.3 Acidez en aceite

El índice de acidez mide la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite. Un alto índice de acidez significa una gran cantidad de estos ácidos, que pueden

neutralizar el catalizador en el proceso de transesterificación, disminuyendo la eficiencia y aumentando los costos. También puede causar corrosión en los equipos de procesamiento. Aceites con alto contenido de ácidos grasos libres pueden requerir un pretratamiento adicional, como esterificación, antes de la transesterificación (Llerena Daza & Aranda Pariasca, 2017).

2.2.4 Índice de yodo

El índice de yodo (IV) sirve para medir el grado de insaturación de lípidos. Resulta importante determinar el contenido de yodo en el aceite para comprobar su susceptibilidad a la oxidación, según indica la normativa para la fabricación de biodiésel (UNE, 2019). Un alto contenido en yodo implica una mayor cantidad de dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados del aceite, lo que aumenta la susceptibilidad del biodiésel a la oxidación, aunque aumenta, también, la calidad del aceite. Preparar las muestras a una elevada temperatura resulta en un índice de yodo menor (Chantachum et al., 2000). De acuerdo con los estándares ASTM, su valor debe encontrarse entre 82 y 88 para una cantidad absorbida por el aceite de 100 g, mientras que los valores típicos en aceite de pescado se encuentran entre 95 y 118 (Bako et al., 2017). El valor máximo de IV para biodiésel, por su parte, es de 120 (UNE, 2018a).

2.2.5 Contenido en agua

El contenido de agua en el aceite crudo puede afectar significativamente el proceso de transesterificación. El agua puede causar la formación de jabones (saponificación) durante la transesterificación, lo que disminuye la eficiencia de la conversión del aceite a biodiésel y complica la separación del biodiésel del glicerol. Un contenido de agua elevado también puede llevar a la formación de emulsiones, que dificultan la purificación del biodiésel (Dwivedi et al., 2006).

2.2.6 Inflamabilidad del aceite

El punto de inflamación (Flash Point) es la temperatura mínima a la cual el aceite o combustible puede formar una mezcla inflamable con el aire. La norma EN 14214 establece un valor mínimo para el biodiésel de 101°C (UNE, 2018a). La importancia de determinar dicho valor reside en la seguridad durante el almacenamiento y manejo.

3 PUESTA EN MARCHA DE UN PROCESO DE OBTENCIÓN DE ACEITE DE PESCADO A ESCALA DE LABORATORIO

3.1 DISEÑO Y PROCEDIMIENTO DEL PROCESO

Tras el estudio bibliográfico llevado a cabo en la fase anterior y con el fin de facilitar y aumentar la accesibilidad a los distintos estudios y documentos a cerca de la extracción del aceite, se ha realizado una **base de datos**, contenida en el ANEXO 1. En ella, se recogen las distintas materias primas (pescados) utilizadas en estos estudios, las etapas y las condiciones de contorno asociadas a cada una de ellas y la posible caracterización del aceite obtenido junto a los parámetros que resultan de interés. Asimismo, el ANEXO 1 contiene una tabla resumen de las etapas y condiciones más favorables a la hora de diseñar un proceso de obtención de aceite para la obtención de biodiésel a escala de laboratorio, teniendo en cuenta equipos fácilmente escalables para su posterior uso local en las zonas pesqueras de Cantabria.

Las decisiones preliminares para empezar a realizar las pruebas en el laboratorio se han tomado con base en estos datos y en los equipos disponibles y sus especificaciones. En el caso de disponer de equipos más especializados, las condiciones de contorno seleccionadas serían las siguientes: (i) 95°C e intervalo tiempo entre 15 y 30 minutos para la cocción; y (ii) un centrifugado con una aceleración de 8000g durante un intervalo entre 10 y 30 minutos. Sin embargo, debido a las limitaciones encontradas durante el proceso y a los equipos existentes en el laboratorio, las condiciones seleccionadas son: **(i) 15 minutos de cocción a una temperatura que asciende progresivamente hasta un valor máximo de 98°C; y (ii) centrifugados a 5000 y 6000 rpm durante 15 minutos.**

Otro problema encontrado durante la puesta en marcha del proceso han sido las diferentes fases encontradas en el aceite. Para poder separar eficientemente dichas fases, se ha utilizado una etapa posterior de extracción líquido-líquido.

La Figura 3 muestra la visión final global del proceso diseñado, que difiere de su versión original al incluir las etapas de extracción líquido-líquido y de evaporación.

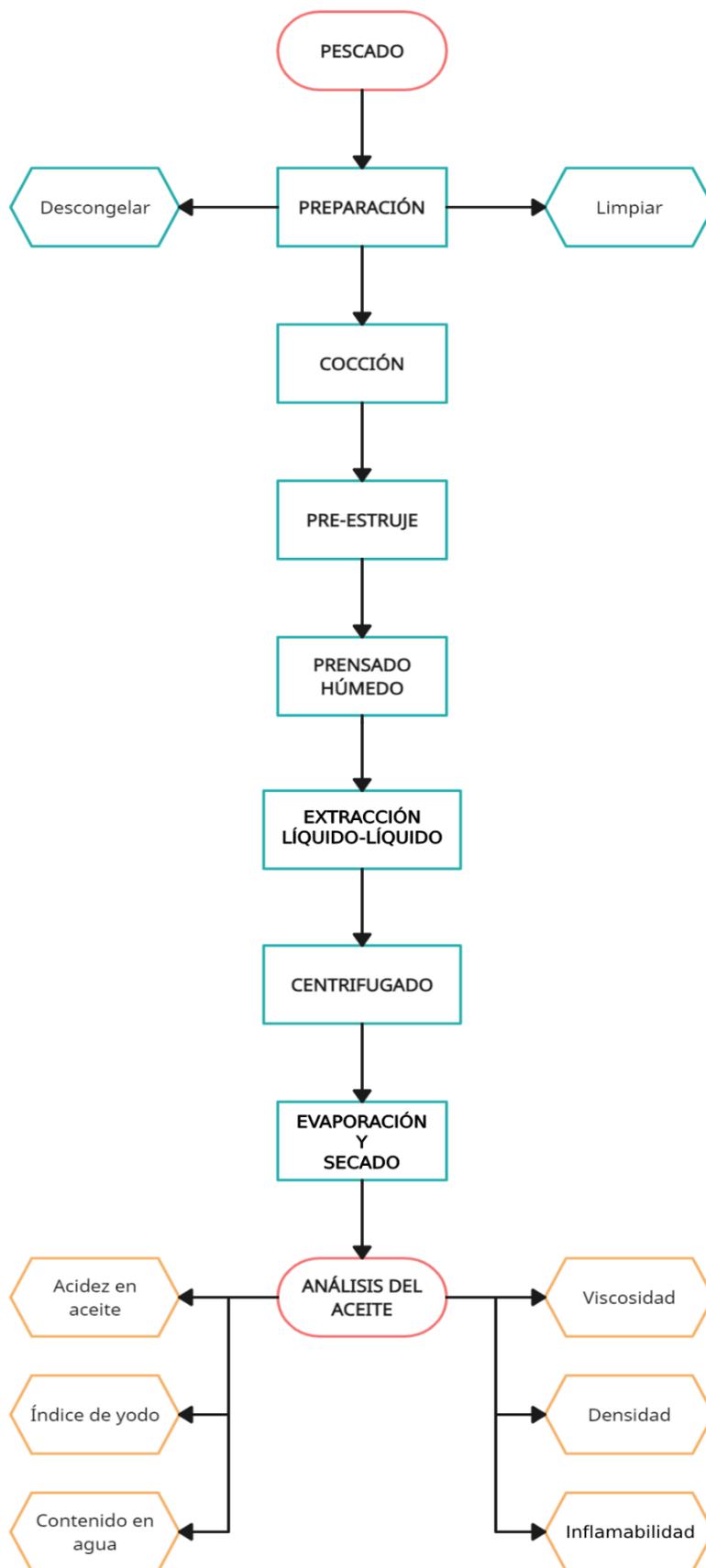


Figura 3. Diagrama del proceso

Antes de comenzar la realización de los experimentos, es necesario definir correctamente cada etapa del proceso, además de poner a punto los equipos seleccionados.

3.1.1 Preparación

El pescado escogido para este estudio es el **bocarte** (*Engraulis encrasicolus*), procedente de la industria pesquera cántabra. El peso de las muestras utilizadas en cada experimento viene determinado por la cantidad de bocartes disponible y el número de experimentos que se quieren realizar. En el caso de que las muestras resulten escasas, se utilizará una mayor cantidad de pescado para experimentos futuros.

Con el fin de evitar la descomposición de las muestras desde su recepción hasta el inicio de los experimentos, se conservan en un congelador a -18°C . El día previo a su utilización, se descongelan a 4°C .

Finalmente, el pescado se lava con agua destilada para limpiar la sangre y otros posibles residuos presentes.

Si el experimento no requiere cocción, pero si troceado, este es el momento en el que se trocea el pescado.

3.1.2 Cocción

Para cocer las muestras de pescado, se ha seleccionado la vaporera *Russell Hobbs 19270-56 71091X*, que se muestra en la Ilustración 4.



Ilustración 4. Vaporera de la marca Russell Hobbs (Russell Hobbs, n.d.)

Su potencia es de 800W y tiene una capacidad máxima de 9 litros.

La temperatura ideal para realizar la cocción, basándose en el estudio bibliográfico previamente realizado, sería de 95°C. Sin embargo, la temperatura de cocción de la vaporera no es regulable, por lo que los experimentos se han realizado hasta un máximo de 100°C, ya que la vaporera, supuestamente, hierve a presión atmosférica. Partiendo de esta suposición, se han realizado tres mediciones de temperatura para comprobar que la hipótesis es correcta. La media de los valores de estas tres mediciones es de, efectivamente, 100°C taponando cualquier salida de aire.

3.1.3 Pre-estruje

Antes de prensar las muestras cocidas, se separan los líquidos del sólido obtenido. De esta manera, se obtiene una mayor pureza de aceite.

En el caso de los experimentos con muestras cocidas que requieren troceado, este es el paso en el que se trocea el pescado.

3.1.4 Prensado húmedo

Para el estruje de las muestras, se han seleccionado tres prensas con distintas cualidades.

La licuadora *Cecotec Juice&Live 2000 EasyClean* mostrada en la Ilustración 5 tiene una potencia de 150W y presenta una velocidad lenta de 70 rpm. La ventaja de esta licuadora es que funciona como prensa en vez de trituradora, minimizando así la pérdida de nutrientes.

Cuenta con tres niveles de licuado. Según el fabricante, es utilizada principalmente para exprimir frutas o helados. Resulta la opción más económica y, quizá, la menos práctica.



Ilustración 5. Licuadora de la marca Cecotec (Cecotec, n.d.)

La prensa Moongiantgo automática de 820W que se muestra en la Ilustración 6 es para obtener aceite a partir de semillas. Trabaja con temperatura y se puede regular. Supone una opción más profesional de cara a la realización de los experimentos, siendo también la más cara.



Ilustración 6. Prensa automática para aceite (Amazon, n.d.-a)

La prensa manual Pavi Craft Brew mostrada en la Ilustración 7, por su parte, presenta una alternativa más rudimentaria. El precio de esta máquina se encuentra entre el de las dos anteriores.



Ilustración 7. Prensa manual (Amazon, n.d.-b)

3.1.5 Extracción líquido-líquido

Una vez obtenida la sustancia resultante del prensado, la presencia de proteínas no solubles en el aceite hace que su extracción mediante el centrifugado no sea del todo pura. Para conseguir una mayor separación de las fases durante el centrifugado, resulta necesaria la adición de otros líquidos. El método más efectivo consiste en mezclar la sustancia del prensado con hexano, ya que permite separar el aceite de las proteínas. Además, dicha mezcla puede también facilitar la separación de otros componentes que puedan estar adheridos a ácidos grasos.

3.1.6 Centrifugado

Una vez obtenida la mezcla, se utiliza una centrífuga para separar en distintas fases los componentes presentes en ella, con el fin de extraer solo la capa superior que contiene aceite y hexano.

El equipo disponible en el laboratorio es la *Orto Alresa DIGICEN 21 CE 110* de la Ilustración 8, que opera a hasta 16500 rpm con una potencia de 340W.



Ilustración 8. Centrifugadora de la marca Orto Alresa (Orto Alresa, n.d.)

En condiciones óptimas y siendo fieles a otros estudios realizados para la extracción del aceite de pescado, el centrifugado debería realizarse con una aceleración de 8000 g de fuerza (RCF). No obstante, los programas con los que puede funcionar la máquina dependen del tamaño del rotor instalado. La fórmula para pasar de rpm a fuerza g es la siguiente:

$$RCF = \frac{1,118 \cdot r(mm) \cdot rpm^2}{1000000}$$

Atendiendo a esta fórmula, el radio del rotor de la máquina influye directamente en el cálculo. Teniendo en cuenta que el radio de uno de los dos únicos rotores disponibles en el laboratorio es de 132 mm, la conversión de 8000 g equivale a aproximadamente 7356 rpm. La velocidad límite de la centrífuga es de 16500 rpm, por lo que no debería existir ningún impedimento. Sin embargo, debido a estos rotores, de diferentes diámetros (264 mm y 290 mm) y capacidades de tubos Falcon (6 y 4 tubos), no permiten alcanzar los valores deseados. El que cuenta con capacidad para 6 tubos permite alcanzar 6000 rpm (5312 RCF), mientras que el otro permite un máximo de 5000 rpm (8105,5 RCF).

Por otro lado, el rango de duración es de 10 a 30 min, por lo que se escogen 15 minutos.

3.1.7 Evaporación y secado

Por último, una vez extraída la capa superior compuesta por aceite y hexano, se deja reposar al aire libre durante un día para evaporar todo el contenido en hexano del aceite. Después, se procede al secado de la muestra para eliminar su contenido en agua. Para una mayor fidelidad con los estudios previamente realizados sobre la extracción del aceite de pescado, se podría volver a utilizar la vaporera para el secado del aceite. Sin embargo, se ha optado por la utilización de una estufa para obtener mejores resultados. Se trata de una estufa DRYGLASS 2000381 de JP Selecta como la que se muestra en la Ilustración 9.



Ilustración 9. Estufa de la marca JP Selecta (SELECTA sau, n.d.)

3.2 EXPERIMENTOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.2.1 Diseño de experimentos

El diseño inicial del proceso de obtención del aceite se recoge en el ANEXO 2. Sin embargo, dado que este trabajo es el inicio de esta investigación en la Universidad de Cantabria, ha habido una serie de acontecimientos inesperados al inicio de su práctica y se ha tomado la decisión de reestructurar su diseño. Con el objetivo de ayudar a las personas que puedan seguir con esta investigación, se ha decidido mantener en los anexos la información inicial.

Este se centra en estudiar y comparar la extracción del aceite mediante diferentes métodos en base al aprendizaje adquirido a través de los distintos contratiempos

surgidos durante el proceso y a las limitaciones del equipo disponible, con el fin de encontrar el método más adecuado. Algunas de estas diferencias residen en los tiempos de cocción, el tipo de prensa utilizada o el troceado del pescado. Dichas condiciones se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Tabla de experimentos del enfoque seguido

Número de experimento	Cocción	Troceado	Prensado
1	Sí (15 min)	Sí	Automático (200°C)
2	No	Sí	Automático (200°C)
3	Sí (15 min)	No	Manual

Además, resulta imprescindible llevar un registro de las cantidades que se descartan en cada etapa y de las que se utilizarán en el siguiente proceso, hasta llegar a la cantidad final obtenida.

3.2.2 Análisis de los parámetros clave

A continuación, se detalla el procedimiento de cada uno de los análisis que se deben llevar a cabo para la correcta caracterización del aceite obtenido mediante los experimentos.

Densidad (UNE 84156)

Para determinar la densidad del aceite, se pesan en un picnómetro, sucesivamente, volúmenes iguales del aceite esencial y agua a 20 °C (UNE, 2000b).

Para ello, en primer lugar, es necesario comprender lo siguiente acerca de la densidad:

- Densidad relativa a 20 °C: es la relación de la masa de un volumen dado del aceite a 20 °C con respecto a la masa de un volumen igual de agua destilada a 20 °C. Es adimensional.

- Densidad absoluta a 20 °C de un aceite esencial: es la relación de la masa de un volumen dado del aceite a 20 °C con respecto al mismo volumen. Medida en g/ml.

1. Reactivos

Agua destilada, recientemente hervida y enfriada seguidamente hasta 20 °C aproximadamente.

Sulfato de magnesio, o sulfato de sodio, recientemente desecado. Para desecar el sulfato de magnesio o el sulfato de sodio, se calienta hasta masa constante a 180 °C–200 °C (temperatura tomada en el producto en agitación constante). Se pulveriza hasta polvo fino y se mantiene en un matraz seco cerrado herméticamente.

2. Materiales

- Estufa, que alcance una temperatura de, como mínimo, 200 °C.
- Matraces Erlenmeyer
- Equipo de filtración apropiado
- Picnómetro de cristal de 5 ml de capacidad nominal mínima.
- Baño de agua, capaz de ser mantenido a 20 °C ± 0,2 °C.
- Termómetro de precisión, graduado de 10 °C a 30 °C, con divisiones de 0,2 °C ó 0,1 °C.
- Balanza analítica de precisión, con una exactitud de 0,001g.

3. Preparación de la muestra

Se transfiere el aceite esencial a un matraz Erlenmeyer de manera que se llene, como máximo, hasta los dos tercios de su capacidad. (UNE, 2000a)

Se introduce en el matraz una cantidad del agente desecante (sulfato de magnesio o sulfato de sodio) que represente alrededor del 15% de la masa del aceite esencial. Durante un periodo de 2 h, como mínimo, se agita de vez en cuando y vigorosamente; y se filtra la muestra, a continuación. Se comprueba la acción del agente desecante, mediante la adición de alrededor de 5% de sulfato de magnesio o sulfato de sodio. Se esperan 2 h y se filtra. El agente desecante debe mantenerse en forma pulverulenta y el aceite esencial debe estar claro y límpido.

4. Procedimiento

- Preparación del picnómetro: se limpia con cuidado el picnómetro y después se enjuaga sucesivamente con etanol y acetona, y a continuación se seca el interior mediante una corriente de aire seco (UNE, 2000b). Si fuera necesario, se seca el exterior con un trapo seco o papel de filtro. Cuando se alcance la temperatura de equilibrio entre la caja de la balanza y el picnómetro, se pesa el picnómetro con su tapón, si lo tuviera, con precisión de 1 mg.
- Pesada del agua destilada Se llena el picnómetro con agua destilada. Se sumerge el picnómetro en el baño de agua. Una vez transcurridos 30 min se ajusta el agua al enrase, si fuera necesario. Se pone el tapón al picnómetro, si lo tuviera, y se seca el exterior al igual que antes con un trapo seco o papel de filtro. Cuando se alcance la temperatura de equilibrio entre la caja de la balanza y el picnómetro, se pesa este último con tapón, si lo tuviera, con precisión de 1 mg.
- Pesada del aceite esencial Se vacía el picnómetro y a continuación se limpia y se seca según se especifica en el apartado 1. Se procede como se especifica en el apartado 2, reemplazando el agua por la muestra de ensayo preparada.

5. Cálculo

La densidad relativa d_{20}^{20} viene dada por la siguiente ecuación:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

donde:

- m_0 es la masa, en gramos, del picnómetro vacío determinada en el apartado 1.
- m_1 es la masa, en gramos, del picnómetro lleno de agua, determinada de acuerdo con el apartado 2.
- m_2 es la masa, en gramos, del picnómetro lleno de aceite esencial, determinado de acuerdo con el apartado 3.

La densidad relativa se expresa con tres cifras decimales.

Si se requiere la densidad absoluta del aceite esencial, se multiplica el valor obtenido para la densidad relativa por la densidad absoluta del agua a 20 °C (0,998 23 g/ml).

Viscosidad (UNE 55-105-73)

La viscosidad del aceite se determina en función de la temperatura (UNE, 1973).

Se mide el tiempo que una cantidad de agua tarda en pasar por el viscosímetro. Para ello, se utiliza un viscosímetro de Oswald.

1. Materiales

- Viscosímetro capilar.
- Termostato, que deberá mantener la temperatura con una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, tanto en lo que respecta a las oscilaciones en el tiempo, como entre las diferentes posiciones del baño.
- Cronómetro graduado en divisiones de 0,2 s y con una precisión de $\pm 0,05\%$, efectuada la prueba en intervalos de 15 min.
- Soportes para colocar el viscosímetro o viscosímetros en el baño termostático en posición vertical.

2. Preparación de la muestra

La cantidad necesaria de aceite deberá filtrarse previamente a una temperatura de unos 10°C por encima de aquella a la que se vaya a efectuar la determinación, agitándose el líquido para conseguir la eliminación de los gases disueltos. La filtración deberá realizarse a través de una placa filtrante de vidrio, porosidad 2. La utilización de papel de filtro no es recomendable. La muestra deberá estar preparada durante el tiempo necesario para conseguir la estabilización de la temperatura.

3. Procedimiento

- Colocado el viscosímetro en posición invertida, se introduce en la muestra el extremo A, haciendo succión por el otro extremo B mediante un tubito de goma ajustado a la boca del tubo. Se deja entrar la materia grasa hasta alcanzar la marca b situada en el extremo del segundo bulbo. De esta forma el volumen introducido en el instrumento será el determinado por los dos bulbos y el del capilar situado en la parte superior del brazo A.

- Una vez cargado, se vuelve a su posición normal colocándose en el baño termostático, cuidando de que esté situado en posición rigurosamente vertical, quedando el extremo inferior a una distancia mínima de 2 cm del fondo del baño.
- Se espera el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio térmico entre el líquido del termostato y el viscosímetro con la grasa que contiene.
- Una vez alcanzado el equilibrio térmico, mediante un tubito de goma ajustado a la boca A, se aplica succión, haciendo subir el nivel de la grasa contenida en el viscosímetro hasta alcanzar una altura de unos 5 mm por encima de la marca a. Se interrumpe la succión, dejando que descienda libremente el líquido en el instrumento, poniendo en marcha el cronómetro en el momento que el menisco superior pasa por la marca a entre los dos bulbos, parando el cronómetro en el momento que el menisco alcance la marca b.
- Se anota el tiempo de flujo, expresado en segundos, registrado en el cronómetro, al que designaremos t. Se repite esta operación dos veces, tomando la media de las dos determinaciones que no deben discrepar entre ellas más del 0,2%.

4. Cálculo

A partir del tiempo de flujo t, expresado en segundos, se obtiene la viscosidad cinemática expresada en centistokes por la fórmula:

$$\nu = C \cdot t$$

donde:

- C es la constante de calibración del sistema de medida, expresado en centistokes por segundo.
- t es el tiempo de flujo, en segundos.

Por otra parte, la viscosidad dinámica viene expresada en centipoises por la siguiente fórmula:

$$\eta_t = \nu_t \cdot \rho_t$$

donde, referidas a la temperatura t:

- ν_t es la viscosidad cinemática
- ρ_t es la densidad, determinada según la norma UNE 55-005.

Acidez en aceite (ISO 660)

1. Disolventes e indicadores

Para medir la acidez en el aceite se necesita un disolvente, como el hidróxido sódico o el potásico (UNE, 2021).

Además, al ser una grasa de origen animal, se recomienda utilizar una mezcla de disolventes de un volumen de etanol de una fracción en volumen $\varphi \approx 96\%$ (por ejemplo, 25 ml) y tres volúmenes de terc-butíl metíl éter o tolueno (por ejemplo, 75 ml). Justo antes de su uso, se neutraliza por adición de una disolución de hidróxido potásico en presencia de 0,3 ml de una solución indicadora coloreada por cada 100 ml de mezcla de disolventes.

Por otro lado, se necesita también un indicador, como Timolftaleína (número de CAS: 125-20-2) o azul alcalino 6B (número de CAS: 1324-76-1), disolución en etanol, de una concentración en masa $\rho = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$.

2. Aparatos utilizados

- Bureta, de 10 ml de capacidad, graduada en divisiones de 0,02 ml, de clase A conforme a la Norma ISO 385.
- Bureta, de 25 ml de capacidad, graduada en divisiones de 0,05 ml, de clase A conforme a la Norma ISO 385.
- Balanza analítica, capaz de proporcionar lecturas con una precisión de 0,001 g.
- Aparato de titulación automática (basado en un electrodo potenciométrico) o potenciómetro.
- Electrodo de pH combinado, para titulaciones ácido/base no acuosas.
- Matraces aforados graduados, de 1000 ml de capacidad, de clase A conforme a la Norma ISO 1042.

3. Preparación de la muestra

La muestra para ensayo se prepara conforme a la Norma ISO 661. Si la muestra contiene ácidos grasos volátiles, la muestra para ensayo no debe calentarse ni filtrarse.

4. Procedimiento

Existen varios métodos para analizar este parámetro, sin embargo, se ha escogido el de **disolvente en frío con indicador**. Los pasos son los siguientes:

- Dependiendo del valor esperado de índice de acidez, se escoge la masa de porción para ensayo y la concentración de álcali (para grasas animales, el índice de acidez aproximado es de 0 a 1, siendo la masa de la porción para ensayo de 20 g, 0,1 mol/l de concentración de NaOH o KOH y 0,05 g de exactitud de pesada de la porción para ensayo).
- Se pesa la porción para ensayo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Se añaden entre 50 ml y 100 ml de la mezcla de disolventes neutralizada y se disuelve la porción para ensayo, calentando suavemente en caso necesario. Para las muestras de altos puntos de fusión, se utiliza una mezcla de etanol-tolueno.
- Tras la adición del indicador, se titula bajo agitación constante utilizando una disolución de hidróxido sódico o de hidróxido potásico. El punto de equivalencia de la titulación se alcanza cuando la adición de una sola gota de álcali produce un cambio de color ligero pero inequívoco que permanece durante 15 s como mínimo.

5. Cálculo

El índice de acidez, expresado como fracción en masa, se obtiene de la siguiente fórmula:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m}$$

donde

- c es la concentración exacta de disolución volumétrica estándar de hidróxido sódico o hidróxido potásico utilizada, en moles por litro.

- V es el volumen de la disolución volumétrica estándar de hidróxido sódico o hidróxido potásico utilizada, en mililitros.
- m es la masa de la porción para ensayo, en gramos.

Por otro lado, el contenido de acidez o de ácidos grasos se calcula mediante la fórmula:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m}$$

donde

- M es la masa molar del ácido escogido para la expresión de los resultados (282 g/mol para grasa animal), conforme al tipo de grasa, en gramos por mol.

Índice de yodo (ISO 3961)

El índice de yodo sirve para medir el grado de insaturación de lípidos (UNE, 2019).

1. Reactivos

Para analizar este parámetro, se necesitan una serie de reactivos además del agua.

- Yoduro potásico, disolución de 100 g/l en agua preparada el mismo día del ensayo.
- Disolución de almidón. Se mezclan 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua y se añaden 1000 ml de agua en ebullición, manteniéndola durante 3 minutos y dejándolo reposar hasta que se enfríe. Se prepara cada día.
- Tiosulfato sódico, disolución patrón volumétrica en agua 0,1 mol/l normalizada. Dura 7 días.
- Disolvente: mezcla de volúmenes iguales de ciclohexano y ácido acético glacial.
- Reactivo de Wijs que contenga monocloruro de yodo en ácido acético y sea comercial.

2. Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 500 ml con tapón de vidrio.
- Pipeta de 25 ml

- Bureta de 50 ml con fracciones de 0,1 ml o dispositivo automático de precisión equivalente.
- Balanza analítica de precisión mínima ± 1 mg.

3. Preparación de la muestra

La muestra de ensayo no se debe calentar ni filtrar.

Se pesan en un matraz entre 0,13 y 0,15 g de muestra.

Para índices de yodo inferiores a 100, la masa de la porción para análisis se debería ajustar conforme a las indicaciones de la Norma EN ISO 3961.

La masa de la porción para análisis se debe ajustar cuando el índice de yodo sea inferior a 100 g de yodo/100 g.

4. Procedimiento

- Se pesa la muestra en el matraz de 500 ml y se añaden 20 ml de disolvente (pueden utilizarse para arrastrar la muestra si se ha pesado en un cacito)
- Se añaden 25 ml de reactivo de Wijs con una pipeta de precisión. Se pone el tapón, se agita suavemente y se guarda en oscuridad.
- Se prepara el blanco utilizando el mismo disolvente y reactivo de los pasos 1 y 2 pero sin muestra.
- Se dejan los matraces en oscuridad durante una hora.
- Después, se añaden 20 ml de la disolución de yoduro potásico y 150 ml de agua.
- Se valora con la disolución patrón de tiosulfato sódico hasta que el color amarillo casi haya desaparecido.
- Se añaden unas gotas de la disolución de almidón y se continúa valorando hasta que el color azul desaparezca tras una agitación muy enérgica.
- Se realiza el mismo ensayo con el blanco.

5. Cálculos

Se calcula el índice de yodo, expresado y redondeado a g de yodo/100 g de FAME según la siguiente ecuación:

$$W_I = \frac{12,69 \cdot c \cdot (V_1 - V_2)}{m}$$

donde:

- c es la concentración exacta de la disolución patrón volumétrica de tiosulfato sódico en mol/l.
- V_1 es el volumen de disolución patrón volumétrica de tiosulfato sódico utilizada en el ensayo del blanco en ml.
- V_2 es el volumen de disolución patrón volumétrica de tiosulfato sódico utilizada en el ensayo de la muestra en ml.
- m es la masa de la porción de muestra en g.

Contenido en agua (ISO 8534)

El principio de este análisis se basa en la siguiente reacción (UNE, 2017a):



1. Reactivos

Reactivos Karl Fisher: son reactivos de un componente o de dos componentes para la determinación volumétrica.

- Reactivos de un componente: contienen todos los componentes en una única solución de titulación. En el caso de las grasas y los aceites, se utiliza una mezcla de metanol y cloroformo puros (el contenido en metanol debería ser como mínimo un 25% de la fracción volumétrica, y de forma óptima un 50% de la fracción volumétrica).
- Reactivos de dos componentes: contienen todos los componentes necesarios para llevar a cabo la titulación, pero en dos soluciones diferentes. El agente de titulación, conocido como título, contiene únicamente yodo y metanol, mientras que el solvente, que contiene el resto de los componentes del reactivo Karl Fisher, es el utilizado en las células de titulación.

Agua patrón: agua comercial patrón con una concentración certificada de 10 mg/g (1,0% de la fracción másica).

2. Materiales

- Aparato Karl Fisher, calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante para la determinación del contenido de agua en grasas y aceites. La rutina de mantenimiento sigue el protocolo recomendado por el fabricante. Se utiliza un recipiente hermético y no se sitúa el aparato en zonas con una humedad elevada. Se evita situar el material o las muestras de análisis cerca de fuentes de agua como grifos, fregaderos o lavavajillas en el laboratorio.
- Balanza analítica, que permita leer hasta 0,1 mg.
- Jeringas de vidrio, con capacidad para 10 ml en el caso de agua patrón 10,0.

3. Preparación de la muestra

La determinación de agua en la muestra se realiza ajustando el tamaño de muestra para que esta tenga entre 1 mg y 100 mg de agua para la titulación volumétrica (cuerpo principal de esta norma internacional) y entre 10 µg y 10 mg para la titulación coulométrica utilizando el instrumental Karl Fisher y sus reactivos, que han de estar validados con soluciones patrón de agua en los intervalos necesarios. Para la determinación volumétrica, en la titulación se debe usar una cantidad mínima de reactivo Karl Fisher de 0,5 ml.

4. Procedimiento

4.1. Titulación

- Se debe determinar diariamente para cada botella.
- Se prepara el material de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para la calibración.
- Se añaden de 20 ml a 40 ml de solvente de trabajo al recipiente de titulación. El solvente debería cubrir los electrodos de platino.
- Se titula el recipiente hasta que alcance un punto final seco estable.
- Se determina el título utilizando agua patrón y una jeringa. La masa de muestra se calcula por diferencia.
- Se pesa, con una aproximación de 0,1 mg, 1 g de agua patrón dentro de una jeringa, situada sobre la balanza analítica.

- Para abrir la ampolla, se retira una pequeña parte del patrón para enjuagar la jeringa es suficiente entre 1 ml y 2 ml. Se enjuaga el interior de la jeringa y se desecha el sobrante. Inmediatamente después, se transfiere el patrón restante a la jeringa y se eliminan las burbujas de aire de esta. Utilizando la masa por diferencia se realizan al menos tres inyecciones con la jeringa.
- Cuando la masa se presenta estable, se calibra la balanza.
- Se inyecta la muestra de agua dentro del recipiente de titulación y se cierra.
- Se coloca la jeringa nuevamente en la balanza. Se registra la masa de agua inyectada con una aproximación de 0,1 mg. La masa mostrará como un valor negativo.
- Se introducen las masas de muestra en el aparato.
- Se comienza la titulación y se registra del título cuando se alcance el punto final de estabilidad. Algunos aparatos pueden requerir el cálculo del título a partir del porcentaje de agua mostrado.
- Se realizan un promedio de tres determinaciones del título. Se registra la media aritmética.
- Se actualiza el aparato de titulación con el nuevo equipo. El título, $\rho_{título}$, en miligramos por mililitro, se puede calcular a partir de la ecuación:

$$\rho_{título} = \frac{m_s \cdot w_{H_2O,s}}{V_{título}}$$

donde:

- m_s es la masa, en gramos, del agua patrón.
 - $w_{H_2O,s}$ es el contenido en agua del agua patrón certificada.
 - $V_{título}$ es el volumen, en mililitros, de la solución de valoración utilizada.
- El título no debería cambiar de forma significativa en la rutina de trabajo realizada de un día a otro, salvo que se abra una botella de solución de valoración nueva. Puede existir un problema si la diferencia en el valor del título es mayor del 10% tras utilizar la solución de valoración un día u otro, pero

ambas procedentes de la misma botella. Si el equipo ha sido calibrado después de 12 h de haber sido utilizado, la bureta debería ser limpiada y el envase de titulación repuesto antes de una nueva titulación. Se cambia el desecante de las botellas de reactivo para minimizar las variaciones en el reactivo de titulación tal y como recomienda el fabricante.

4.2. Porción para análisis

- Mediante una jeringa, se pesa e introduce una porción de la muestra dentro del equipo (0,1% de fracción másica de contenido en, 5 g como mínimo de masa y 5 mg de contenido en agua en la porción para análisis). Para la titulación se deben utilizar, al menos, 0,5 ml de reactivo Karl Fisher.
- Las masas de las porciones para análisis se calculan por diferencia.
- Se coloca la porción para análisis, en una jeringa de tamaño adecuado, sobre la balanza.
- Cuando se alcanza el peso estable, se calibra la balanza.
- Inmediatamente se coloca el contenido de la jeringa en el envase de titulación.
- Se coloca de nuevo la jeringa en la balanza. Cuando se alcanza el peso estable, se registra la masa con una aproximación de 0,1 mg.

4.3. Determinación

- Se añaden de 20 ml a 40 ml de solvente de trabajo al recipiente de titulación. El solvente debería cubrir los electrodos de platino.
- Se titula el recipiente hasta que alcance un punto final seco estable.
- Se pesan e introducen las porciones para análisis en el aparato de acuerdo con el apartado anterior.
- Se registra el contenido de porción para análisis de la muestra cuando ésta alcance un punto final seco estable.
- Se pueden analizar hasta seis porciones para análisis antes de sustituir y pretitular el disolvente de trabajo.

- a. Se sustituye el solvente de trabajo si el precipitado indica que las porciones para análisis no se han disuelto totalmente.
- b. Se pretitula el solvente de trabajo si hay un retraso de más de 10 min entre los análisis de las porciones para análisis sobre el mismo recipiente de solución de trabajo.
- c. La cantidad de solvente, añadido a un recipiente de titulación (en un sistema de doble componente), determina la cantidad máxima de agua que puede ser titulada. El volumen de solvente o de mezcla de solventes debería proporcionar de 60 mg a 100 mg de capacidad de agua.
- d. El número de porciones para análisis que deben ser tituladas antes de reemplazar y rehidratar la solución de trabajo depende de la solubilidad de la muestra, la capacidad reactiva del sistema de doble componente y de la capacidad del recipiente. El volumen inicial de solvente de trabajo añadido utilizando el sistema de doble componente establece la cantidad máxima de agua que puede ser titulada. La selección de seis muestras de análisis sirve como guía, pero puede variar dependiendo del contenido de agua, del reactivo de titulación y de la solubilidad de la muestra.

5. Cálculo

El aparato completa automáticamente los cálculos. El contenido en agua, $w_{H_2O,t}$, en gramos por 100 g de muestra, se calcula según la ecuación:

$$w_{H_2O,t} = \frac{V_{\text{título}} \cdot \rho_{H_2O} \cdot 100}{m_t \cdot 1000}$$

donde:

- $V_{\text{título}}$ es el volumen, en mililitros, de la solución de valoración utilizada.
- ρ_{H_2O} es el título (agua equivalente del reactivo, en miligramos de agua por mililitro).
- m_t es la masa, en gramos, de la porción para análisis.

Inflamabilidad (EN ISO 2719)

La determinación de la temperatura de inflamación (punto de inflamación) viene recogida en la norma UNE-EN ISO 2719:2017 (UNE, 2017b).

1. Materiales

- Aparato de Pensky-Martens en taza cerrada.
- Termómetros adaptables al aparato, con intervalos de 1°C y comprendiendo los límites entre los cuales se presume se han de situar las temperaturas a medir. Deberán haber sido debidamente contrastados, con una tolerancia de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- Barómetro de lectura de la presión absoluta, con precisión de $\pm 0,5$ kPa, y con una resolución de 0,1 kPa.
- Baño de calentamiento u horno, para calentar la muestra si es necesario, capaz de controlar la temperatura a $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

2. Reactivo

Disolvente de limpieza, para la eliminación de trazas de la muestra del vaso de ensayo y la tapa.

3. Preparación de la muestra

A menos que se especifique otra cosa, las muestras representativas para análisis se obtienen de acuerdo con los procedimientos dados en las Normas ISO 3170, ISO 3171, ISO 15528 o una norma nacional equivalente.

Cuando se tome una muestra de fuelóleo residual, el recipiente de muestra se debe llenar hasta solo entre el 85% y el 95% de su capacidad. Para muestras FAME, se recomienda llenar hasta el 85% un recipiente específico de un litro. Para otros tipos de muestras, el tamaño del contenedor se debe elegir de tal manera que el recipiente no esté lleno más del 85% o menos del 50% de su capacidad, antes de ser tomada cualquier parte alícuota de la muestra.

Se tomará la muestra de ensayo a una temperatura al menos 18 °C por debajo del punto de inflamación esperado.

4. Procedimiento

- Se registrará la lectura de la presión barométrica absoluta del laboratorio en el momento del ensayo.
- Se llenará el vaso de ensayo con la muestra de ensayo hasta el nivel indicado por la marca de llenado. Se colocará la tapa sobre el vaso de ensayo y se introduce éste en la cámara de calentamiento. Se asegurará que el dispositivo de bloqueo está encajado adecuadamente y se inserta el dispositivo de medida de temperatura. Se prende la llama de ensayo y se ajusta a un diámetro de 3,2 mm a 4,8 mm o se enciende la fuente de ignición alternativa. Se suministra calor a una velocidad tal que la temperatura de la porción de muestra a ensayar se incremente, según la lectura del termómetro, de 2,5 °C/min a 3,5 °C/min, y se mantendrá esta velocidad de calentamiento hasta el final del ensayo. Se agitará la muestra de ensayo a una velocidad rotativa de 90 r/min a 120 r/min, agitando en sentido descendente.
- Para el primer ensayo de la muestra se usará un punto de inflamación esperado de 100 °C.
- Cuando la temperatura de la porción de ensayo sea aproximadamente 24 °C más baja que la del punto de inflamación esperado, se realizará la primera aplicación de la fuente de ignición y a partir de entonces a intervalos de temperatura que sean múltiplos de 2 °C. Se detendrá la agitación y se aplicará la fuente de ignición accionando el mecanismo de la tapa que controla el obturador y la fuente de ignición, de tal forma que la fuente se baja hasta dentro de la zona del vapor dentro del vaso de ensayo en 0,5 s, manteniéndose en posición baja durante 1 s, y subiendo rápidamente a su posición alta.
- Se registrará como punto de inflamación observado, la temperatura de la muestra de ensayo, leída en el dispositivo de medida de temperatura, cuando la aplicación de la fuente de ignición cause un destello perceptible en el interior del vaso de ensayo.
- Cuando se detecte un punto de inflamación en la primera aplicación de la fuente de ignición, el ensayo se debe suspender, descartando el resultado y repitiendo el ensayo con una nueva muestra de ensayo. Se recomienda que la

primera aplicación de la fuente de ignición se realice aproximadamente 24 °C por debajo de la temperatura a la que se detectó el punto de inflamación en la primera aplicación.

- Cuando la temperatura a la que se observe el punto de inflamación sea menor de 16 °C o más de 30 °C por encima de la temperatura de la primera aplicación de la fuente de ignición, el resultado del ensayo se considerará aproximado. Se repetirá el ensayo utilizando una nueva porción de muestra, ajustando la temperatura de la primera aplicación de la fuente de ignición hasta que se obtenga una determinación válida, de tal forma que el punto de inflamación obtenido esté entre 18 °C y 28 °C por encima de la temperatura de la primera aplicación de la fuente de ignición.

5. Cálculo

El punto de inflamación corregido se calcula como:

$$T_c = T_d + 0,25 \cdot (101,3 - p)$$

donde:

- T_d es el punto de inflamación observado en °C
- p es la presión barométrica absoluta, expresada en kPa
- 0,25 es una constante, expresada en °C/kPa
- 101,3 es la presión atmosférica estándar, expresada en kPa

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Realización de experimentos y resultados

Tras calibrar todos los equipos necesarios para la extracción del aceite, se procede a la preparación de los experimentos detallada en el ANEXO 2. La Tabla 3 recoge un resumen de las decisiones tomadas, que finalmente son respetadas tanto para el experimento inicial de prueba como para los válidos. Una vez definidas, se da paso a la realización de los experimentos.

Tabla 3. Datos de la preparación de experimentos

Peso aproximado de las muestras (g)	800
Temperatura de congelado (°C)	-18
Temperatura de descongelado (°C)	4
Tiempo de descongelado (h)	24

Experimento 0

Este experimento, denominado “0” y finalmente considerado de prueba, sirve para sentar las bases del diseño final de experimentos enunciado en el apartado 3.2.1 y es fruto del diseño preliminar presentado en el ANEXO 2.

Tras seguir las indicaciones para descongelar la bolsa almacenada, se procede a limpiar la muestra con agua destilada. Se ha considerado separar espinas, cabezas u otros restos del pescado antes, durante y después del troceado, pero no se ha llevado a cabo debido a que estas son las partes que más interesaría utilizar para la extracción de este tipo de aceite a gran escala. El peso de la muestra tras el limpiado es de **803,97 g**.

Tras cocer la muestra dividida en dos bandejas durante **10 minutos** en la vaporera, se puede comprobar que el pescado apenas está cocido, ya que la temperatura ni siquiera alcanza los 100°C transcurrido este tiempo. Por eso, se decide probar directamente a cocer durante **60 minutos**. Se comprueba, además, que se alcanzan **98°C** a los 12 minutos de cocción.

Una vez transcurrido el tiempo, se extrae el líquido que ha soltado el pescado durante la cocción de la vaporera, interpretando que la mayor parte de ese líquido sea agua. Tiene un volumen de **500 ml** y se muestra en la Ilustración 10.



Ilustración 10. Líquido de cocción del experimento 0

El peso de la muestra de pescado una vez cocida, por su parte, es de **634,34 g** (Ilustración 11). Se procede a trocear la muestra antes del prensado. Se puede observar que la cocción del pescado es excesiva, siendo la textura de los trozos demasiado pastosa.



Ilustración 11. Muestra de pescado cocida

Se introducen los trozos de la muestra en la **licuadora Cecotec**, ya que es la opción más económica. Sin embargo, por esa misma razón y según lo esperado, esta se atasca, ya que está pensada para alimentos mucho más digeribles. La pastosidad de la muestra también puede facilitar al atascamiento de la máquina. Además de atascarse y no prensar como es debido, el resultado que se obtiene hasta el momento no es el deseado, ya que no es líquido, sino una especie de pasta como la de la Ilustración 12.



Ilustración 12. Pasta de prensado

Debido a este contratiempo, se procede a centrifugar el líquido obtenido durante la cocción. Es un líquido amarillento que, a priori, ni parece ni se espera que tenga un alto contenido en aceite. Tras introducir 6 tubos en la centrífuga para la primera ronda, aún restan 270 ml. Tras finalizar el programa (**6000 rpm durante 5 minutos**), se comprueba que todos los tubos Falcon excepto dos, se han perforado, echando a perder la muestra en su interior. Los dos Falcon intactos son aquellos que cuentan con un refuerzo cilíndrico envolviendo el precipitado. En ellos, se pueden apreciar dos fases bastante diferenciadas. Una de ellas, en el fondo, de color amarillento; mientras que la otra, en la capa superior, parece ser aceite, pero carece de un volumen importante, por lo que se puede asumir que el aceite obtenido del líquido de cocción es prácticamente despreciable.

La realización de este experimento, que finalmente ha resultado ser de prueba, ya que, a partir de aquí, el enfoque del diseño del resto de experimentos cambia drásticamente, ha servido para aprender y mejorar ciertos aspectos del proceso. Por un lado, el tiempo de cocción debería ser bastante inferior a 60 minutos y superior a 10, ya que no se logra alcanzar la temperatura máxima. De esta manera, la muestra no estará ni poco cocida ni demasiado pastosa, facilitando el prensado. Por otro lado, se ha visto que el líquido de cocción no supone un significativo contenido en aceite, por lo que cuando menos cocción tenga la muestra, menor cantidad de este líquido debería obtenerse. Además, se ha podido comprobar que, para la centrifuga, son necesarios unos Falcon específicos. Por último, la licuadora Cecotec ha dejado de ser una opción viable, por lo que se procede a adquirir los otros dos tipos de prensa. Se espera que la automática para aceite de semillas, que trabaja con calor, funcione debido su precio y propiedades, pero se adquiere también la manual como alternativa, pudiendo así realizar una comparación entre ambos métodos.

Finalmente, se puede llevar a cabo el diseño final de los experimentos:

Experimento 1

El peso de la muestra tras lavado es de **792,4 g**, manteniendo las condiciones de preparación anteriores.

Se reparte la muestra en dos bandejas durante la cocción, que es de **15 minutos**. Esto se debe a que con 10 no se alcanza la temperatura máxima. Durante el tiempo de cocción se realizan varias medidas de la temperatura, como muestra la Tabla 4.

Tabla 4. Temperatura de cocción cada 5 minutos

A los 5 min	A los 10 min	A los 15 min
53°C	86°C	98°C

El peso de la muestra tras la cocción es de **622,86 g** siendo el volumen del líquido de cocción de **275 ml** (Ilustración 13).

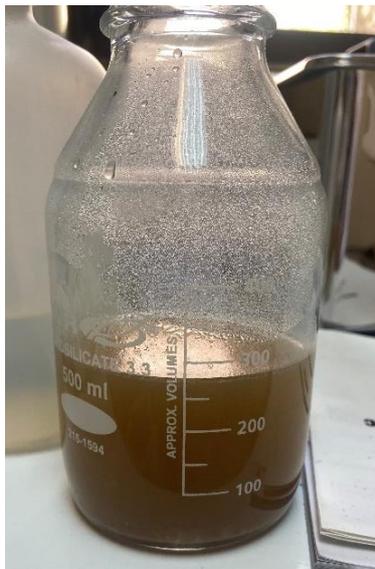


Ilustración 13. Líquido de cocción del experimento 1

Se trocean las muestras antes del prensado (Ilustración 14).



Ilustración 14. Muestra troceada del experimento 1

En este experimento, se utiliza la prensa automática para semillas, que se precalienta durante 600 segundos a 200°C. El prensado se realiza a una temperatura de **200°C** durante **25 minutos**, debido al tamaño del embudo y del tornillo.

El líquido obtenido tras el prensado es de **210,03 g (207 ml)** (Ilustración 15), mientras que el peso de los desechos que salen prensados debido al calor y al tornillo es de **60,87 g**. La cantidad restante es una pasta de **351,96 g** recuperada del tornillo, la prensa o los recipientes (Ilustración 16).

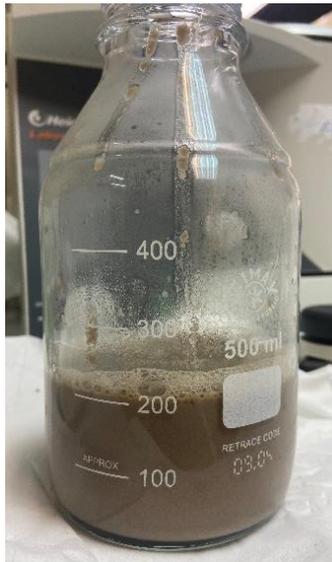


Ilustración 15. Líquido de prensado del experimento 1



Ilustración 16. A la izquierda, los desechos prensados; a la derecha, la pasta restante

El centrifugado se realiza en dos tandas, una con el líquido de cocción y otra con el de prensado. Del líquido de cocción se llenan 6 Falcon con 40 ml, guardando 22 ml sin centrifugar. En cambio, del prensado se llenan 6 tubos con 30 ml y 25 ml sobrantes. El tiempo de centrifugado para ambas es de **15 minutos** a **6000 rpm**

(Ilustración 17). La razón por la que guardar pequeñas cantidades de cada muestra reside en tener la capacidad de poder realizar análisis futuros con muestras que no hayan pasado por todo el proceso, en caso de ser necesario.

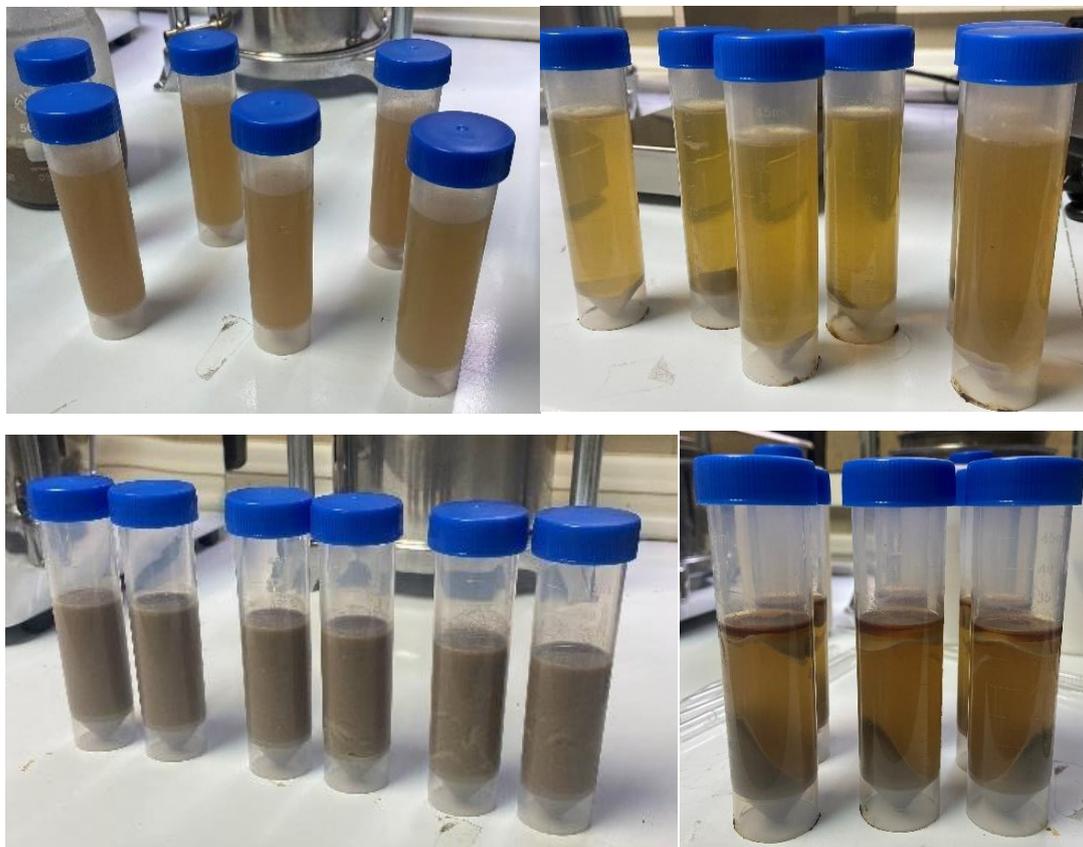


Ilustración 17. Arriba, las muestras de cocción, abajo las de prensado, ambas antes y después del centrifugado

Se comprueba que del líquido de cocción a penas se obtiene aceite, por lo que es despreciable, mientras que del líquido del prensado se extraen **18,41 g** con una pipeta Pasteur, como se aprecia en la Ilustración 18.



Ilustración 18. Aceite extraído del líquido de prensado

El secado se realiza en la estufa, a una temperatura de **65°C** para no quemar el aceite. Se deja secar durante **un día**, resultando en **17,45 g** (Ilustración 19). Una vez sacado de la estufa, se deja enfriar con gel de sílice para evitar que absorba humedad. En frío, el peso de la muestra es de **15,71 g** (Ilustración 20).



Ilustración 19. Secado y muestra

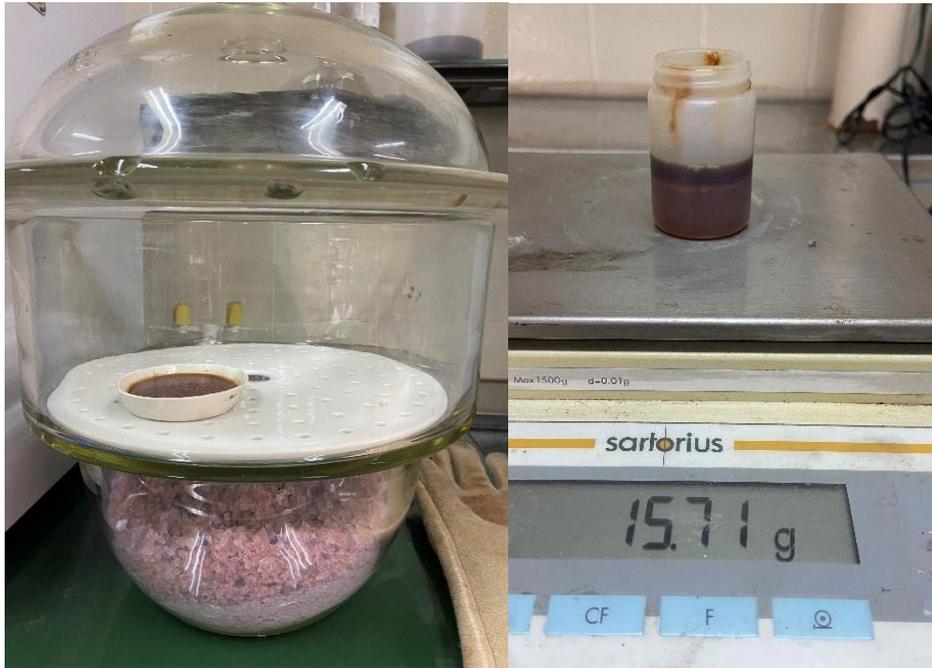


Ilustración 20. Enfriado y muestra final

Experimento 2

En este caso, la muestra es de **798,05 g** tras el lavado.

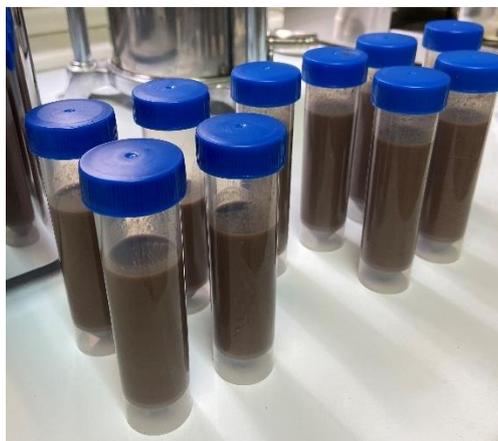
La cocción está ausente en este experimento debido a que el prensado en la máquina para semillas se realiza a una temperatura de **200°C**. Se trata de comprobar si esto supone un exceso de cocción que pueda ser perjudicial para obtener el aceite. De esta manera, no se obtiene líquido de cocción.

El prensado se realiza con la muestra troceada, justo después de haberse lavado. Esta vez, el prensado se realiza en **20 minutos**, debido a la crudeza de la muestra y su facilidad para pasar por el tornillo, a diferencia de las muestras cocidas que son más pastosas. El líquido de prensado es de **389,88 g (390 ml)**, mostrado en la Ilustración 21. Los desechos, por su parte, son de **214,82 g**, sin contar los **193,35 g** sobrantes de pasta.



Ilustración 21. Líquido de prensado del experimento 2

El centrifugado se realiza también en dos tandas de **15 minutos a 6000 rpm**, solo que esta vez ambas contienen el líquido de prensado (Ilustración 22). En la primera, son 6 Falcon de 40 ml, mientras que en la segunda son 4 de 35 ml. Se guardan los 10 ml sobrantes sin centrifugar.



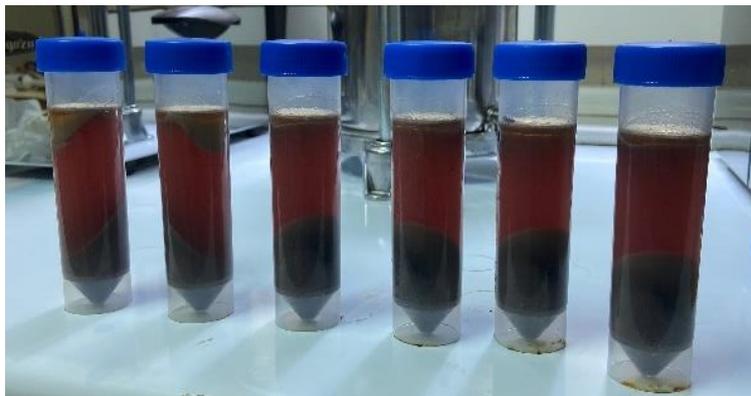


Ilustración 22. Arriba, el líquido sin centrifugar; abajo, centrifugado

Se retira la fase superior del tubo con la pipeta y se obtienen **48,38 g**, como muestra la Ilustración 23.



Ilustración 23. Aceite extraído del experimento 2

Tras el secado durante **un día** entero a **65°C** en la estufa se obtienen **28,59 g**, de los cuales quedan **27,62 g** tras enfriar en gel de sílice (Ilustración 24).



Ilustración 24. Muestra 2 antes y después del enfriado

Experimento 3

Para el tercer experimento, se toma una muestra de **801,64 g**.

La cocción se realiza durante **15 minutos**, obteniendo un líquido de cocción de **290 ml** y una muestra de **630,53 g**, mostrada en la Ilustración 25.

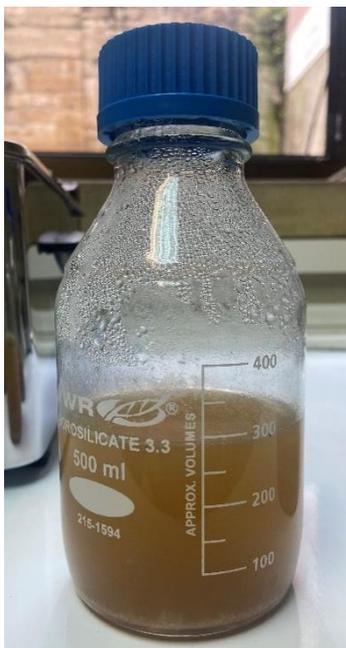


Ilustración 25. Líquido de cocción del experimento 3

En este caso, la muestra **no se trocea**, ya que el prensado es **manual** y se espera que se obtengan menos restos sólidos que troceando. Se obtienen **138,69 g (150 ml)** de líquido de prensa, mientras que se obtienen **491,84 g** de desechos (Ilustración 26).



Ilustración 26. Líquido de prensado y desechos del experimento 3

El centrifugado se realiza a **6000 rpm** durante **15 minutos**, con una tanda de 6 Falcon con 45 ml de líquido de cocción en cada uno y otra de 4 Falcon de 35 ml de líquido de prensa en cada uno. Sobran sin centrifugar 20 ml y 10 ml, respectivamente (Ilustración 27).

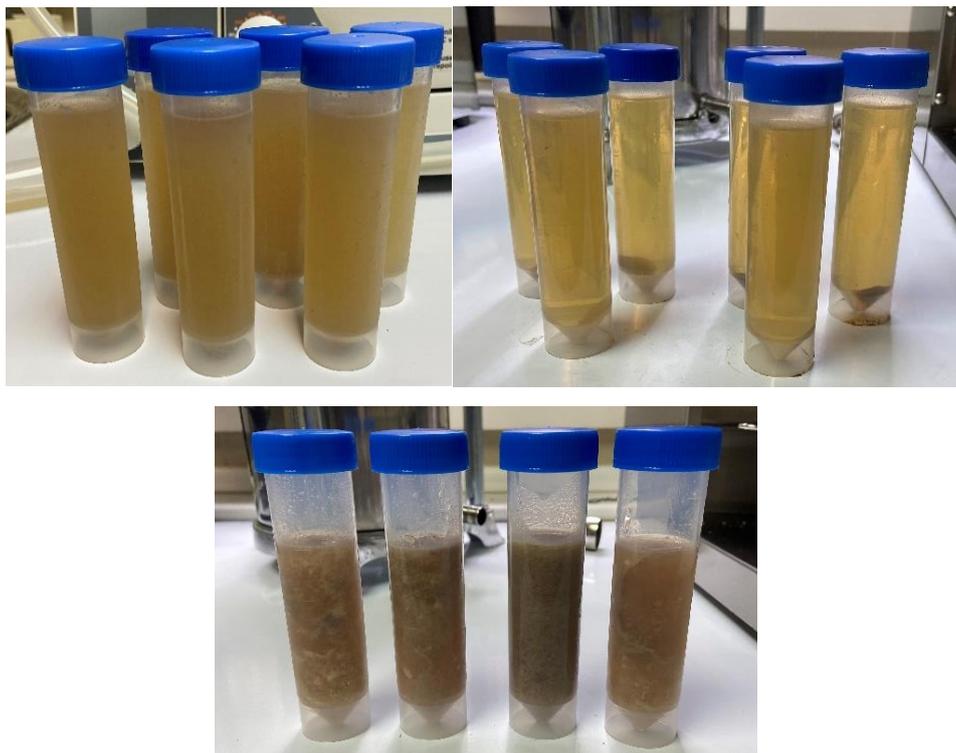


Ilustración 27. Arriba, el líquido de cocción antes y después del centrifugado; abajo, el de prensado centrifugado

Como en el resto de los experimentos con cocción, el aceite que aparece en la capa superior del líquido de cocción es despreciable, mientras que, en el líquido prensado mostrado en la Ilustración 28, es de **20,23 g**.

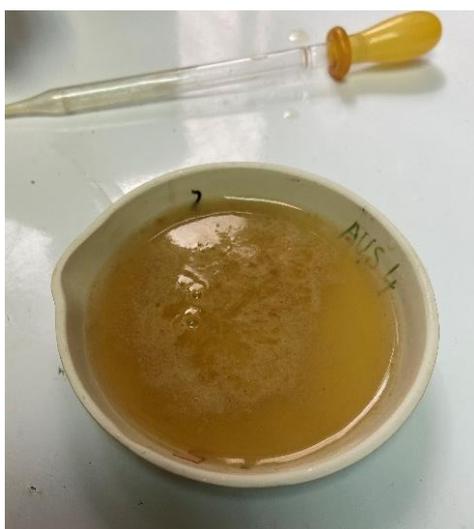


Ilustración 28. Aceite extraído del experimento 3

Tras secarlo en la estufa a **65°C** durante **un día**, el peso es de **17,45 g**, obteniendo **16,97 g** tras enfriarlo en gel de sílice (Ilustración 29).



Ilustración 29. Aceite 3 antes y después del enfriado

A partir de este punto, con el fin de simplificar la identificación de cada tipo de muestra obtenida en los experimentos, se refiere a la fase inferior del líquido de prensado que permanece en el Falcon después de la extracción de la capa superior como *líquido impuro*. De esta manera, se resultan 3 muestras distintas: líquido de cocción, líquido impuro y aceite. La Tabla 5 recoge las cantidades de todas las muestras presentes en el proceso.

Resumen de sustancias obtenidas y desechadas

Tabla 5. Resumen de las cantidades utilizadas y desechadas en cada experimento

Nº experimento	Muestra (g)	Muestra tras cocción (g)	Líquido cocción (ml)	Líquido prensado (g-ml)	Desechos prensado (g)	Pasta de desecho (g)	Líquido cocción no utilizado (ml)	Líquido prensado no utilizado (ml)	Aceite de cocción extraído (ml)	Líquido impuro (g)	Aceite de prensado extraído (g)	Aceite tras secado (g)	Aceite tras enfriado (g)
0	803,97	634,34	500	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
1	792,4	622,86	275	210,03-207	60,87	351,96	22	25	≈ 0	191,62	18,41	17,45	15,71
2	798,05	-	-	389,88-390	214,82	193,35	-	10	≈ 0	341,5	48,38	28,59	27,62
3	801,64	630,53	290	138,69-150	-	491,84	20	10	≈ 0	118,46	20,23	17,45	16,97

Análisis y rediseño de experimentos

Tras la obtención de las tres muestras de aceite mediante la realización de los experimentos, se precisan ciertos análisis para caracterizar el aceite de bocarte. Dado que el volumen de las muestras es escaso, se priorizan los siguientes análisis: densidad, contenido en agua y acidez, en ese orden.

Con el fin de determinar la **densidad** y, siguiendo los pasos de la normativa, se preparan las muestras en un baño de agua a 30°C, debido a que estaban contenidas en botes de plástico. De haberse conservado en vidrio, se hubiesen preparado a 20°C.

Se llena un matraz aforado de 5 ml con la muestra del primer experimento, se pesa y se obtiene que:

$$d = \frac{m}{V} = \frac{5,0809g}{5ml} = 1,01618 \text{ g/ml}$$

Este resultado no concuerda con el valor esperado, 0,927 g/ml (Llerena Daza & Aranda Pariasca, 2017). Esta es una de las razones por las que, sumada a la poca homogeneidad de las muestras, se necesita centrifugar cada una de ellas de nuevo para lograr una mejor separación de las fases.

Se realiza un nuevo **centrifugado** a **5000 rpm** durante **15 minutos**. Después, se extrae la capa superior de cada uno de los tubos Falcon y se introducen en viales de 2 ml (Ilustración 30). Esta nueva capa, entonces, representa la muestra de aceite extraído, mientras que a la capa inferior que se conserva en el Falcon se le denomina *crudo*. Actualizando la lista de los diferentes tipos de muestra en base a esta nueva información, ahora los líquidos existentes son 4: líquido de cocción, líquido impuro (tras un solo centrifugado), crudo (tras dos centrifugados) y aceite (tras dos centrifugados).

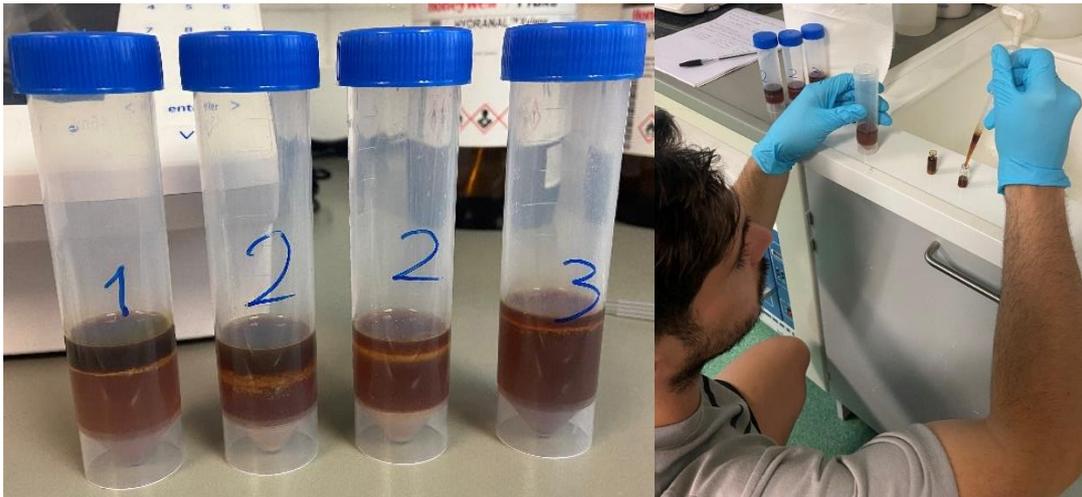


Ilustración 30. Introduciendo la capa superior en viales de 2 ml

La Tabla 6 recoge el peso de las muestras de aceite, así como las del crudo restante:

Tabla 6. Peso de las muestras de aceite y de crudo tras el segundo centrifugado

Muestra 1			Muestra 2				Muestra 3
Vial 1 ₁	Vial 1 ₂	Vial 1 ₃	Vial 2 ₁	Vial 2 ₂	Vial 2 ₃	Vial 2 ₄	Vial 3
1,575g	1,6041g	0,5672g	1,8896g	1,8599g	1,7815g	1,6691g	1,7237g
3,7463g			7,2001g				1,7237g
Crudo 1 (g)			Crudo 2 (g)				Crudo 3 (g)
11,9637			20,4199				15,2463

Todavía se observan varias fases dentro de cada uno de los viales de aceite, posándose una fase aparentemente más sólida en su parte inferior. Se realiza de nuevo el cálculo de la densidad. Los valores son los siguientes: **1,05 g/ml** para la muestra 1, **1,082 g/ml** para la muestra 2 y **1,044 g/ml** para la muestra 3.

Los resultados siguen siendo parecidos, por lo que se procede a analizar el contenido en agua de cada una de las tres muestras para intentar averiguar cuál es el problema.

Tomando **0,0185 g** del vial 1₁, **0,0171 g** del vial 2₂ y **0,0219 g** del vial 3, el contenido en agua de las muestras es **1,87%**, **5,08%** e **indeterminado**, respectivamente. La indeterminación viene dada por el elevado tiempo de realización del análisis, que supone un valor de humedad superior al 5%, por lo que la máquina no es capaz de determinarla. Se prueba a aumentar el tiempo de análisis a una hora, tomando otra muestra de **0,02038 g**, pero el resultado vuelve a ser el mismo. Tras los análisis, la nueva cantidad de las muestras de aceite es de **3,7278 g** para la **muestra 1**, **7,183 g** para la **muestra 2** y **1,6814 g** para la **muestra 3** (Ilustración 31).



Ilustración 31. Muestras de aceite, en los viales, y de crudo, en los Falcon

Teniendo en cuenta estos malos resultados y atendiendo a la todavía baja homogeneidad de los viales, se realizan más pruebas con el fin de determinar la composición de cada fase.

Por un lado, se realiza una **prueba de pH** en uno de los viales. Cuando se trata de proteínas, el pH 12 se corresponde con las que presentan un mayor número de aminoácidos polares y se disuelven completamente en una solución acuosa; mientras que el pH 3 y, en menor medida el pH 4, a las que no son solubles debido al contenido de un mayor número de aminoácidos apolares, permaneciendo, así, al fondo de la solución (Menéndez, 2014). En este caso, el resultado es cercano al cuarto valor de la escala (Ilustración 32) y, dado que la fase más sólida se encuentra en la parte inferior, es altamente probable que conste de proteínas que no son solubles en el aceite a temperatura ambiente. Para comprobar su solubilidad, se calienta un vial de cada tipo de muestra en un baño de agua a 50°C. Transcurrido un tiempo, se aprecia

una mayor homogeneidad de las fases, pero no el suficiente para asegurar que se trate de proteínas, cristales u otros componentes no solubles en el aceite a temperatura ambiente pero sí a valores más altos.



Ilustración 32. Muestra cercana a pH 4

Se contempla entonces la posibilidad de separar las supuestas proteínas del aceite con agua, pero finalmente se opta por extraer directamente el aceite de las muestras mediante la utilización de **n-hexano**, tomando una pequeña cantidad de la muestra 2.

Se mezclan **0,6 ml** del vial 2₄ con **0,6 ml** de hexano. Tras agitar la mezcla y esperar durante unos minutos, se aprecian dos fases claramente distinguidas. Se extraen entonces **0,5 ml** de la capa superior de dicha mezcla, que contienen aceite y hexano, y se guardan en el frigorífico, para futuros análisis, junto con los **0,7 ml** restantes de la mezcla que contienen tanto aceite con hexano como las supuestas proteínas (Ilustración 33).



Ilustración 33. A la izquierda, la mezcla con supuestas proteínas; a la derecha, solo la mezcla

Atendiendo a estos resultados, se verifica la presencia de posibles proteínas con baja solubilidad. Para confirmar que se trata de proteínas, basta con añadirles a una disolución salina acuosa para que, de esta manera, sus iones contribuyan a aumentar la polaridad de la proteína (Menéndez, 2014). Por lo tanto, se pueden mezclar con una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) de 0,01 ml, que equivale a un valor de pH de 12. Para llevarlo a cabo, primero se tiene que extraer el resto de la capa superior de la mezcla que contiene aceite y hexano al vial en el que se encuentran los 0,5 ml ya extraídos, de tal manera que solo estén presentes las proteínas. Después, se mezclan con una cantidad de agua destilada acorde a su volumen. En este caso, se utilizan 15 ml de agua destilada y se obtiene su pH. El valor ronda entorno a pH 5.5, que, sumado a las visibles trazas dentro del recipiente, reafirma la baja solubilidad de las proteínas. A continuación, se pretende añadir la solución de hidróxido de sodio. Sin embargo, dado que cabe la posibilidad de que haya otros componentes además de las proteínas, resulta mejor opción mezclarlo con una solución de 0,1 ml para facilitar su disolución y que pueda alcanzar un valor de pH 12. Para ello, se ha utilizado un volumen de 6 ml de dicha solución, pudiéndose apreciar un color más opaco de la mezcla debido a la disolución de las proteínas, así como trazas visiblemente más pequeñas, que podrían ser restos de materia orgánica (Ilustración 34).

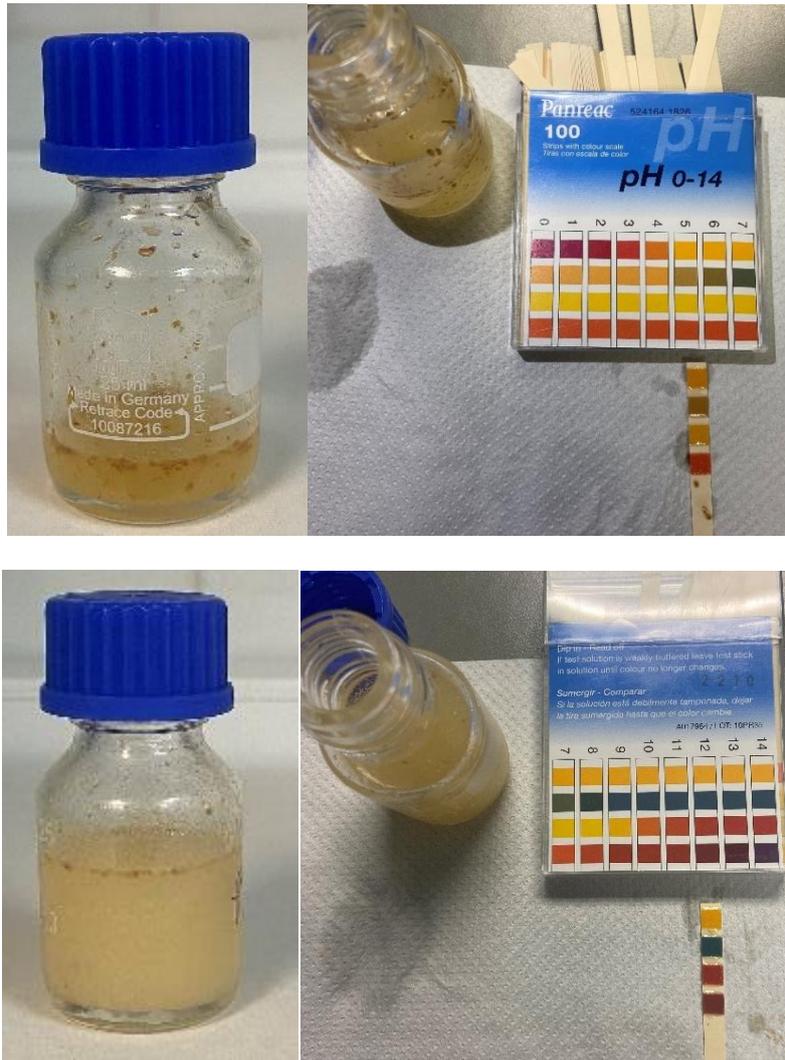


Ilustración 34. Arriba, la mezcla con la solución de 0,01 ml; abajo, con la de 0,1 ml

Tras demostrar el contenido de las muestras, el siguiente paso consiste en extraer el aceite real de cada una de ellas, para poder caracterizarlo correctamente. Para ello, se utilizan también las muestras de crudo, ya que una vez conocida la presencia de proteínas es posible que también contengan aceite.

Se comienza por verter en un tubo Falcon el resto de la muestra de aceite 2 que no ha sido utilizada, es decir, la de los viales 2₁, 2₂, 2₃, la restante del vial 2₄ (sin las proteínas) y el crudo 2. Seguido, se mezcla aproximadamente con el mismo volumen de **n-hexano**. Se agita vigorosamente y se centrifuga durante **15 minutos a 5000 rpm**, equilibrando la máquina con un tubo de agua de peso similar. Una vez

centrifugado, se retira la capa superior, que contiene aceite mezclado con hexano, casi en su totalidad y se deposita en un crisol. Lo que resta en el Falcon, se vuelve a mezclar con un volumen similar de hexano y se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones. Una vez completada la separación, se extrae la capa superior restante y se deposita en el crisol. Finalmente, se deja **reposar** un día entero con el fin de evaporar todo el hexano y obtener el volumen real de aceite extraído. El peso del aceite obtenido es de **3,9742 g** para las muestras de aceite y crudo 2 antes del secado. Tras el secado en una estufa a **60°C** durante **30 minutos** y el enfriado en presencia de gel de sílice, el peso total de aceite es de **3,9691 g** (Ilustración 35). Si se tiene en cuenta que el peso inicial de la muestra es la resta de los 7,183 g restantes tras el análisis de contenido en agua sumados a los 20,4199 g de crudo y de los 0,5003 g tomados para un futuro análisis de acidez, resulta en 27,1026 g de los cuales, el aceite extraído supone el 14,64%.

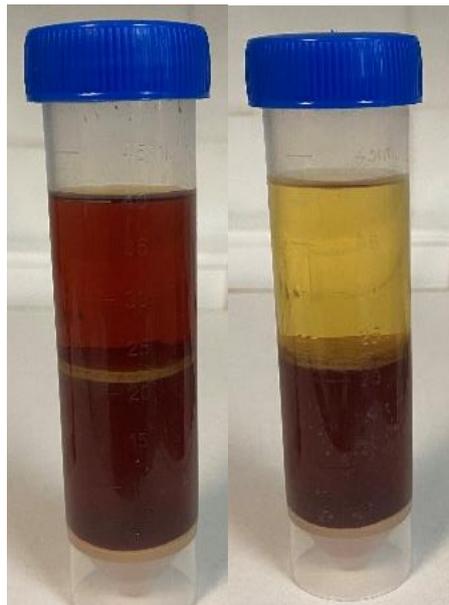


Ilustración 35. Arriba, la muestra antes de cada centrifugado; abajo, el aceite antes y después del evaporado

De esta manera, lo que se denominaba crudo se convierte ahora en *crudo residual* tras la mezcla con el hexano. Las sustancias obtenidas a lo largo de todo el proceso, por lo tanto, hasta este punto, son 4: líquido de cocción, líquido impuro (tras un solo centrifugado), crudo residual (tras dos centrifugados previos y dos más después de añadir hexano) y aceite (mismas condiciones que el crudo residual).

Visto el éxito de la extracción del aceite gracias a la acción del hexano en las muestras de aceite y de crudo, se procede a realizar los mismos pasos para las muestras 1 y 3.

Teniendo en cuenta que, tras el primer análisis de contenido en agua, que resultó erróneo, el peso de partida se redujo a 3,7278 g en la muestra 1 y 1,6814 g en la muestra 3, y si se resta el peso que se va a emplear en el futuro análisis de acidez (0,5115 g para la muestra 1 y 0,5147 g para la muestra 3), el peso restante en ambas muestras es de 3,2163 g y 1,1871 g, respectivamente. Si a esos valores se les suma la cantidad de crudo que había disponible, los pesos iniciales son **15,18 g y 16,413 g**.

Repitiendo el mismo proceso para separar el aceite de la muestra 2 se tiene que, para las muestras 1 y 3, el aceite extraído es de 4,7009 g y 3,1342 g, respectivamente (Ilustración 36).



Ilustración 36. A la izquierda, la muestra 1; a la derecha, la muestra 3

Las cantidades de aceite real extraído de cada muestra de aceite y crudo y su peso inicial tras el primer análisis de contenido en agua se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Cantidad de aceite extraído a partir de la cantidad tomada de cada muestra

Peso inicial de 1	Peso inicial de 2	Peso inicial de 3
15,18 g	27,1026 g	16,413 g
Aceite extraído 1	Aceite extraído 2	Aceite extraído 3
4,7009 g	3,9691 g	3,1342 g
30,97%	14,64%	19,1%

Una vez conocida la importancia del hexano a la hora de extraer el aceite de cada muestra, resulta interesante probar su efecto en las del líquido impuro apartadas tras el primer centrifugado. Es probable que lo que parecía una fase distinta a la de la capa superior, que en un principio era la que contenía todo el aceite, sea una fase no tan distinta que contenga cierta cantidad de aceite mezclado con proteínas y otros compuestos, aunque quizá en menor proporción.

Las muestras de **líquido impuro** 1 y 2, mezcladas con hexano, dejan ver un cambio de color que indica que pueden contener cierta cantidad de aceite. Sin embargo, la muestra número 3 presenta un color demasiado transparente, por lo que se llega a la conclusión de que la presencia de aceite es, prácticamente, nula (Ilustración 37).

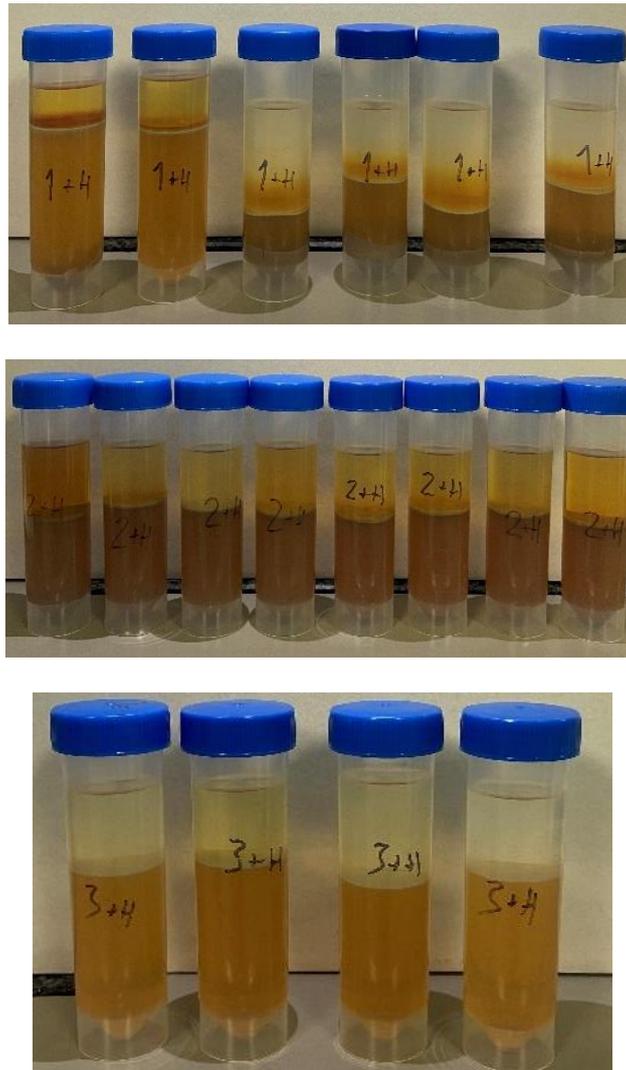


Ilustración 37. Las tres muestras de líquido impuro mezcladas con hexano, después del centrifugado

Dejando evaporar todo el hexano en las dos primeras muestras, tras el secado, las cantidades obtenidas son **1,7727 g** y **3,1315 g**, respectivamente. Por lo tanto, la cantidad total de aceite extraída de cada experimento y la eficiencia de extracción, teniendo en cuenta el peso original de cada muestra antes y después de la cocción, se recogen en la Tabla 8.

Resumen de cantidades de aceite extraído y porcentajes de extracción

Tabla 8. Cantidades finales de aceite extraído y porcentajes de extracción

	Peso total muestra (g)	Peso tras cocción (g)	Peso de aceite + crudo (g)	Peso de líquido impuro (g)	Aceite extraído de aceite + crudo (g)	% Extracción / peso aceite + crudo	Aceite extraído de líquido impuro (g)	% Extracción / peso líquido impuro	Total aceite extraído (g)	% Total aceite extraído / peso tras cocción	% Total aceite extraído / peso total muestra
Experimento 1	792,4	622,86	15,18	191,62	4,7009	30,97	1,7727	0,925	6,4736	1,039	0,817
Experimento 2	798,05	-	27,1026	341,5	3,9691	14,64	3,1315	0,917	7,1006	-	0,890
Experimento 3	801,64	630,53	16,413	118,46	3,1342	19,1	-	-	3,1342	0,497	0,391

Los porcentajes de aceite extraído son más bajos de lo esperado, ya que, en otros peces de la misma familia, el contenido en grasa en ejemplares de entre 10 y 30 g se encuentra entre el 1,25% y 1,97%, calculados para 100 g (Mathew, 2013). Teniendo en cuenta que los ejemplares con los que se han realizado los experimentos se encontraban en un peso cercano a los 20 g, el porcentaje debería rondar el 1,61%. En las tres muestras, los porcentajes de extracción con respecto al peso prensado son inferiores a dicho valor (1,039%, 0,890% y 0,497%, respectivamente). En cambio, si para las muestras 1 y 3 se considera el peso total de la muestra, que incluye la cantidad perdida durante la cocción, los porcentajes son 0,817% y 0,391%, respectivamente. Por lo tanto, fijándose en la extracción total, la muestra 2 resulta la más eficiente de las tres, siendo la tercera la más ineficiente, probablemente debido al prensado manual.

A partir de estos resultados, se procede a caracterizar el aceite extraído de cada uno de los tres experimentos, utilizando el método del hexano. Asimismo, para las muestras 1, 2 y 3 que contienen tanto aceite como crudo solo se realiza el análisis de acidez, ya que los de densidad y contenido en agua estaban finalizados. Cabe recordar que el análisis de humedad se realizó directamente con dicha mezcla, mientras que para el de densidad se utilizó una muestra del aceite previo a la adición del hexano, por lo que también contenía restos de crudo.

3.3.2 Discusión de los análisis clave

Densidad

Debido al escaso volumen de aceite obtenido y al excesivo tamaño del equipo disponible, se realiza un análisis de densidad algo distinto al requerido por la norma, en la que se determina la densidad absoluta a partir de la relativa (UNE, 2000b). Con la ayuda de una micropipeta eyectora autoclavable, se pesa un volumen de 1ml para cada una de las muestras, de tal manera que el cálculo de la densidad será directamente el peso, por cada mililitro, como muestra la Tabla 9.

Tabla 9. Medidas de densidad de las diferentes muestras

Muestra aceite + crudo 1 (g/ml)	Muestra aceite + crudo 2 (g/ml)	Muestra aceite + crudo 3 (g/ml)	Muestra aceite 1 (g/ml)	Muestra aceite 2 (g/ml)	Muestra aceite 3 (g/ml)
1,05	1,082	1,044	0,88	0,928	0,82

Como se puede apreciar en la Ilustración 38, la densidad de la segunda muestra de aceite es un valor casi idéntico al 0,93 g/ml esperado (Llerena Daza & Aranda Pariasca, 2017). Por otro lado, los valores de la primera y tercera muestra de aceite (0,88 g/ml y 0,82 g/ml, respectivamente) difieren del esperado, ya que el líquido obtenido tras la cocción contiene un mayor número de triglicéridos saturados, que son muy pesados, disminuyendo, así, la densidad del aceite obtenido mediante el prensado, en el que la cantidad de este tipo de triglicéridos es menor.



Ilustración 38. Densidad de la muestra de aceite número 2

Acidez

Muestra de crudo 1

En primer lugar, se toman 0,5114 g de la muestra, ya que es suficiente cantidad para realizar el análisis correctamente sin necesidad de tomar un valor mayor. Esto supone

un factor importante para la caracterización del aceite ya que, tras la prueba, el volumen de aceite seleccionado es destruido.

Debido a que, según la normativa, se deben tomar 0,1 mol/l de concentración de hidróxido de sodio para grasas animales (UNE, 2021), si se multiplica por el peso molecular (40 g/mol) resultan 4 g de NaOH. Aplicando una regla de tres, en el caso de utilizar una solución en agua destilada de 100 ml, se necesitan 0,4 g. Por lo tanto, al disponer de hidróxido de sodio en pastillas, se toma un peso real de 0,4654 g, mostrado en la Ilustración 39.

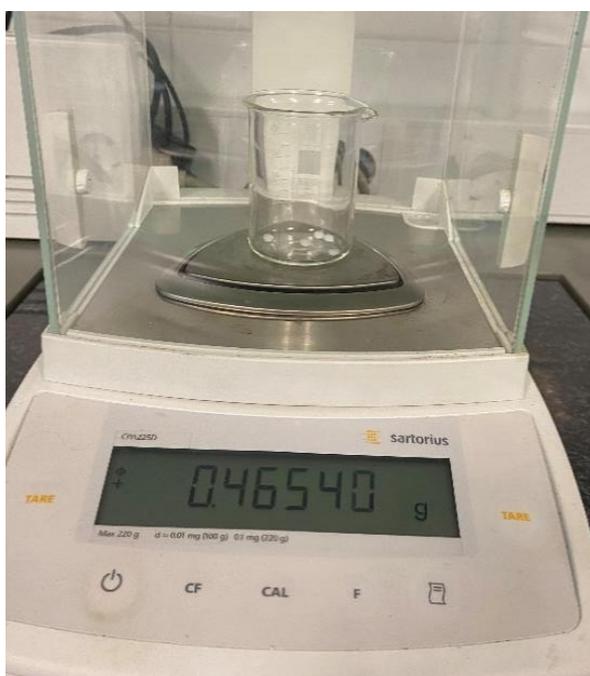


Ilustración 39. Muestra tomada de NaOH

Atendiendo a la norma, 4 g de NaOH es la cantidad necesaria para el ensayo de una masa de 20 g de aceite (UNE, 2021). Sin embargo, dado que la cantidad de aceite obtenida en los experimentos resulta una limitación, se utilizan 0,01 ml de la disolución del NaOH real pesado en agua destilada. Por analogía inversa, equivalen a 0,0011625 mol/l (0,011625 mol/l si se tomaran 0,1 ml). La manera ideal para disolver el hidróxido de sodio sería en etanol 96°. No obstante, al probarlo, el tiempo de disolución es muy elevado, incluso con la ayuda de un agitador y de la temperatura (Ilustración 40).



Ilustración 40. NaOH disolviéndose en un agitador magnético

Por otro lado, se toman 10 ml de la mezcla de disolventes (50 ml de etanol con 50 ml de éter dietílico) y se mezclan, con la ayuda de un agitador, con los gramos tomados de la muestra de crudo. Seguidamente, se añaden varias gotas de fenolftaleína y se mantiene la acción del agitador, mientras se prepara la bureta encima del recipiente (Ilustración 41).



Ilustración 41. Mezcla de disolventes y fenolftaleína preparada debajo de la bureta

En este momento, se añade a la bureta cierta cantidad de la solución de 0,01 ml y se mide su volumen. En este caso, 32,0 ml. Se dejan caer las gotas necesarias para presenciar un cambio de color estable en la mezcla que, en este caso, es de color rosa (Ilustración 42). En ese momento se detiene el goteo y se vuelve a medir el volumen presente en la bureta, 45,4 ml. La rapidez de estabilización del cambio de color depende de la cantidad de muestra tomada. Cuanto menor sea, menos gotas de solución se deben dejarse caer, por lo que el tiempo de estabilización es menor.

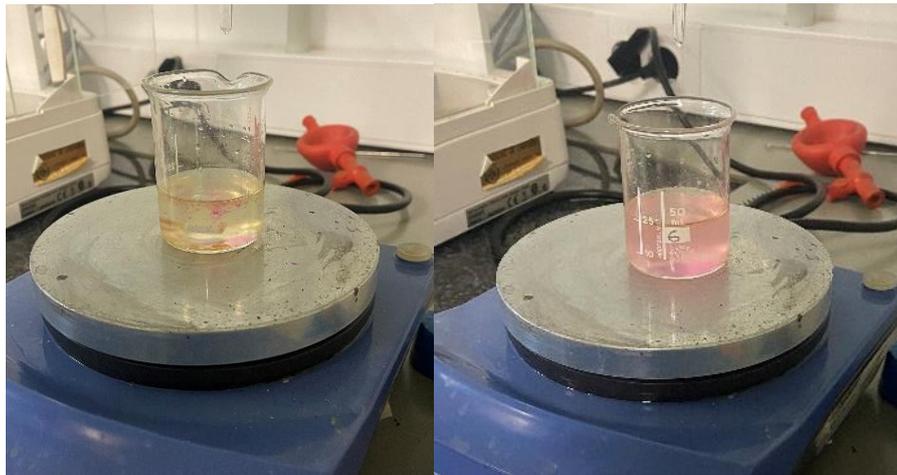


Ilustración 42. Mezcla durante y después de la titulación

Con los siguientes valores, obtenidos tanto de las cantidades tomadas como del proceso, se obtienen el índice de acidez y el contenido en acidez de la muestra.

- $c = 0,0011625 \text{ mol/l}$
- $V = 45,4 \text{ ml} - 32 \text{ ml} = 13,4 \text{ ml}$
- $m = 0,5114 \text{ g}$
- $M = 282 \text{ g/mol}$ (UNE, 2021)

Índice de acidez:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m} = 1,70883 \text{ mg NaOH / g}$$

Contenido en acidez:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m} = 0,85899 \%$$

Muestra de crudo 2 (sobrante de la mezcla con el hexano)

En este caso, la muestra tomada es de 0,5003 g y el volumen de la disolución en la bureta varía de 27,7 ml a 42,4 ml (Ilustración 43).

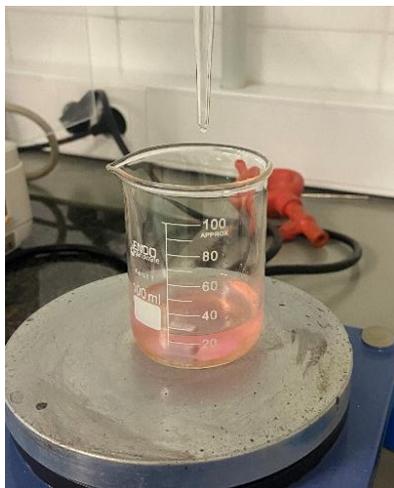


Ilustración 43. Mezcla tras la titulación

Los cálculos, por su parte, son los siguientes:

- $c = 0,0011625 \text{ mol/l}$
- $V = 42,4 \text{ ml} - 27,7 \text{ ml} = 14,7 \text{ ml}$
- $m = 0,5003 \text{ g}$
- $M = 282 \text{ g/mol}$ (UNE, 2021)

Índice de acidez:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m} = 1,91621 \text{ mg NaOH / g}$$

Contenido en acidez:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m} = 0,96323 \%$$

Muestra de crudo 3

En este caso, la muestra tomada es de 0,5147 g y el volumen de la disolución en la bureta varía de 34,2 ml a 45,0 ml (Ilustración 44).



Ilustración 44. Muestra estable

Los cálculos, por su parte, son los siguientes:

- $c = 0,0011625 \text{ mol/l}$
- $V = 45 \text{ ml} - 34,2 \text{ ml} = 10,8 \text{ ml}$
- $m = 0,5147 \text{ g}$
- $M = 282 \text{ g/mol}$ (UNE, 2021)

Índice de acidez:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m} = 1,36893 \text{ mg NaOH / g}$$

Contenido en acidez:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m} = 0,68788 \%$$

Muestra de aceite 1

Para el primer análisis en aceite, la muestra tomada es de 0,1111 g y el volumen de la disolución en la bureta varía de 28,4 ml a 30,4 ml (Ilustración 45).

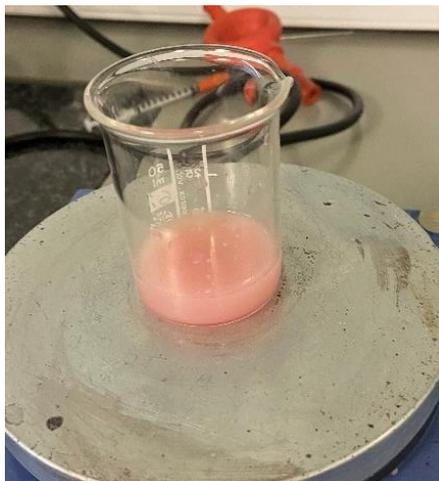


Ilustración 45. Muestra de aceite 1 tras la titulación

Los cálculos, por su parte, son los siguientes:

- $c = 0,0011625 \text{ mol/l}$
- $V = 30,4 \text{ ml} - 28,4 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$
- $m = 0,1111 \text{ g}$
- $M = 282 \text{ g/mol}$ (UNE, 2021)

Índice de acidez:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m} = 1,17401 \text{ mg NaOH / g}$$

Contenido en acidez:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m} = 0,59014 \%$$

Muestra de aceite 2

En este caso, la muestra tomada es de 0,1065 g y el volumen de la disolución en la bureta varía de 30,5 ml a 33,3 ml (Ilustración 46).

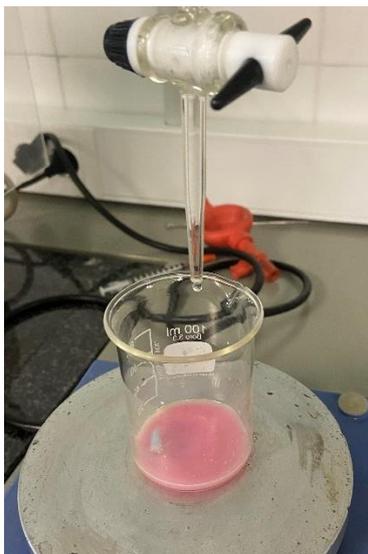


Ilustración 46. Muestra de aceite 2 tras la titulación

Los cálculos, por su parte, son:

- $c = 0,0011625 \text{ mol/l}$
- $V = 33,3 \text{ ml} - 30,5 \text{ ml} = 2,8 \text{ ml}$
- $m = 0,1065 \text{ g}$
- $M = 282 \text{ g/mol}$ (UNE, 2021)

Índice de acidez:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m} = 1,71421 \text{ mg NaOH / g}$$

Contenido en acidez:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m} = 0,86164 \%$$

Muestra de aceite 3

En este caso, la muestra tomada es de 0,0979 g y el volumen de la disolución en la bureta varía de 33,3 ml a 34,9 ml (Ilustración 47).

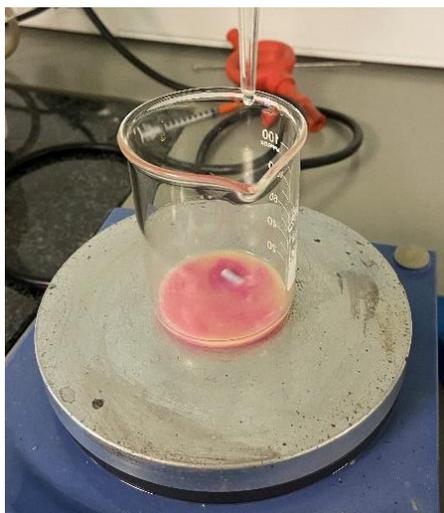


Ilustración 47. Muestra de aceite 3 tras la titulación

Los cálculos, por su parte, son los siguientes:

- $c = 0,0011625 \text{ mol/l}$
- $V = 34,9 \text{ ml} - 33,3 \text{ ml} = 1,6 \text{ ml}$
- $m = 0,0979 \text{ g}$
- $M = 282 \text{ g/mol}$ (UNE, 2021)

Índice de acidez:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \cdot cV}{m} = 1,06584 \text{ mg NaOH / g}$$

Contenido en acidez:

$$W_{FFA} = \frac{VcM \cdot 100}{1000 \cdot m} = 0,53577 \%$$

La Tabla 10 contiene un resumen de todos los resultados de este análisis.

Tabla 10. Resultados del análisis de acidez en las muestras

	Muestra aceite + crudo 1	Muestra aceite + crudo 2	Muestra aceite + crudo 3	Muestra aceite 1	Muestra aceite 2	Muestra aceite 3
Contenido en acidez (%)	0,86	0,96	0,69	0,59	0,86	0,54
Índice de acidez (mg NaOH / g)	1,7	1,9	1,4	1,2	1,7	1,1
Índice de acidez (mg KOH/ g)	2,4	2,7	1,9	1,6	2,4	1,5

El contenido en acidez en otros peces es del 2,43% sin cocción y del 2,82% con cocción. En caso de ser superior al 3,5%, el aceite es, directamente, inservible (Bako et al., 2017). En este caso, las tres muestras de aceite se encuentran por debajo de este porcentaje.

En cuanto a otros peces, el índice de acidez para la obtención de biodiésel en la tilapia del Nilo es de 0,412 mg KOH / g y de 0,306 mg KOH / g para el sorubim híbrido (Menegazzo et al., 2015). Según la norma EN 14214, el índice de acidez debe ser inferior a 0,5 mg KOH/g (0,3562 mg NaOH/g), por lo que las tres muestras de aceite se encuentran por encima de dicho valor.

Contenido en agua

Para el análisis del contenido en agua utilizando el método de Karl Fischer, siguiendo la normativa (UNE, 2017a) y las especificaciones del fabricante de la máquina, se toman cantidades de muestra que permitan determinar una humedad de entre 100 y

1000 µg/g durante la realización del análisis. En este caso, al tratarse de muestras muy pequeñas, con el fin de no perder demasiado volumen se toman los µg necesarios para encontrarse en el límite inferior de dicho intervalo de humedad. En la Tabla 11 se recogen tanto los valores tomados como el porcentaje de contenido en agua de cada muestra.

Tabla 11. Contenido en agua de las muestras

Tipo de muestra	Muestra (g)	Contenido en agua (%)
Aceite + Crudo 1	0,0185	1,87
Aceite + Crudo 2	0,0171	5,08
Aceite + Crudo 3	0,0219	N/S
	0,02038	N/S
Aceite 1	0,01594	0,3147
	0,02545	0,2833
Aceite 2	0,06471	0,7799
Aceite 3	0,03605	0,6342

Existe una correlación entre los resultados obtenidos en las muestras de aceite con crudo 1 y 2 (1) y los obtenidos en las muestras de aceite 1 y 2 (2). Como se puede observar, en ambos tipos de muestra el contenido en agua en las que se ha realizado una cocción (1) es menor que en las que no (2). Sin embargo, no se puede conocer si existe la misma correlación en el tercer experimento, ya que no se han obtenido resultados para el aceite y el crudo. Resulta obvio que contiene una concentración de agua muy elevada, probablemente debido al prensado manual. Además, el alto contenido en agua puede crear emulsiones, que reducen el valor del aceite obtenido (Jayasinghe & Hawboldt, 2012). Si se compara la muestra de aceite 3 con la muestra de aceite 1, que también ha experimentado la etapa de cocción, se puede comprobar que el contenido en agua en la primera es aproximadamente el doble que en la segunda, confirmando este hecho.

Durante el análisis de la primera muestra de aceite, se ha podido percibir un comportamiento extraño en el gráfico mostrado en la Figura 4. Lo normal en este tipo de gráfico es encontrar una caída prácticamente vertical en la parte derecha, una vez se ha terminado todo el reactivo utilizado en el análisis. Una de las posibles razones podría ser la presencia de partículas de agua intramoleculares, que no son detectadas al principio. Sin embargo, esto no parece afectar al porcentaje de humedad de la muestra, ya que, tras un segundo análisis, la gráfica tiene un aspecto similar, y el contenido en agua no varía significativamente.

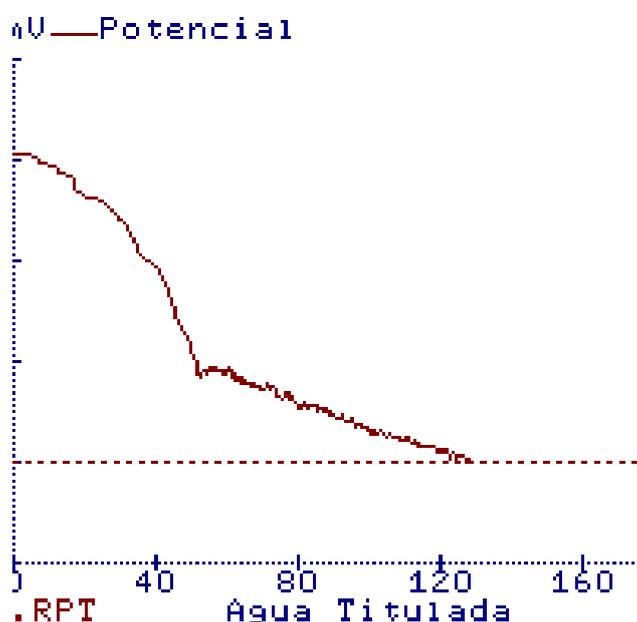


Figura 4. Gráfica de datos de titración de la primera muestra de aceite

Para la fabricación de biodiésel a partir de aceite de bocarte, es crucial mantener el contenido de agua lo más bajo posible, idealmente por debajo de 0.02% (200 ppm) para asegurar la eficiencia del proceso de transesterificación y la calidad del biodiésel final, ya que, la norma EN 14214, establece un contenido máximo de agua de 0.05% (500 ppm) en el biodiésel final (UNE, 2018a). Un contenido bajo de agua ayuda, entre otras cosas, a evitar la hidrólisis de triglicéridos y la formación de ácidos grasos libres, mejorando la estabilidad del biodiésel.

Sin embargo, en este caso, la humedad de las muestras de aceite es bastante más elevada.

Viscosidad

Los viscosímetros disponibles en el laboratorio son demasiado grandes para realizar el análisis con el poco volumen que tienen las muestras de aceite extraído. La cantidad de aceite con crudo disponible, por otro lado, sería suficiente para el cálculo, pero no es recomendable ya que, debido al contenido de trazas más sólidas, el viscosímetro podría obstruirse.

Índice de yodo (IV)

Los valores típicos del índice de yodo en aceite de pescado se encuentran entre 95 y 118 (Bako et al., 2017). Por lo tanto, para la realización del análisis, se toma como referencia un índice de yodo esperado de 100, para el que se necesita una porción de la muestra de 0,317 g y 20 ml de mezcla de disolventes.

Preparación

- El disolvente se obtiene mezclando 50 ml de ciclohexano con 50 ml de ácido acético glacial.
- Se han tomado 10 g de yoduro potásico para su disolución en 100 ml.
- Se han tomado 2,482 g de tiosulfato sódico para su disolución en 100 ml.
- Para la disolución de almidón, se utilizan 5 g.

Realización

Se prepara un blanco mezclando en un matraz Erlenmeyer de 500 ml un volumen de 20 ml de disolvente y 25 ml de reactivo de Wijs. Después, se tapa, se agita y se deja en la oscuridad durante 1h.

Se repite tres veces más, pero añadiendo una muestra de 0,317 g del aceite correspondiente en cada matraz, excepto de la muestra 3, que, debido al poco volumen disponible, se utilizan 0,159 g (Ilustración 48).



Ilustración 48. Arriba, la mezcla antes del reposo de 1h; abajo, después

Una vez cumplidos los tiempos de reacción de cada matraz, se les añade 20 ml de yoduro potásico y 150 ml de agua. Se valora con el tiosulfato sódico hasta que desaparezca casi por completo el color amarillo. Se añaden unas gotas de la disolución de almidón y se continúa con la valoración hasta que desaparezca el color azul tras agitado (Ilustración 49). El volumen de tiosulfato utilizado en el blanco es de 44,0 ml.



Ilustración 49. Las muestras antes, durante y después de la titulación (de arriba abajo: blanco y muestras 1, 2 y 3)

Con todos los parámetros, se hace el cálculo del índice de yodo de cada muestra, recogidos en la Tabla 12.

Tabla 12. Índice de yodo de cada muestra de aceite

	Peso de la muestra (g)	Diferencia de volúmenes de tiosulfato sódico (Vblanco-Vmuestra)	Índice de yodo
Muestra 1	0,317	13,7 ml	121
Muestra 2	0,317	16,6 ml	110
Muestra 3	0,159	39,2 ml	38,3

Se puede comprobar que la muestra 1 se encuentra muy cerca del intervalo típico y, teniendo en cuenta el margen de error, podría decirse que está dentro de él. Sin embargo, la muestra 3 está muy lejana a dicho rango, posiblemente debido a la poca cantidad de muestra utilizada y al prensado manual durante el proceso. Dicho esto, las dos primeras muestras de aceite se encuentran dentro del límite del biodiésel (120), siendo la segunda la más favorable (UNE, 2018a).

Inflamabilidad

Para determinar el punto de inflamación, se utiliza el equipo Setaflash Series 3 30000-3, mostrado en la Ilustración 50.



Ilustración 50. Determinación del punto de inflamación

Se toman pequeñas muestras de cada aceite y se determina la temperatura a la se encuentra el punto de inflamación mediante el modo rampa. Se fija una temperatura inicial y se va introduciendo una nueva llama cada 5'5°C hasta que se detecte dicho punto. Dado que el punto de inflamación del biodiésel debe ser mayor de 101°C (UNE, 2018a), se toma una temperatura de inicio cercana a ese valor, ya que en aceites tendría que ser más alto debido a una mayor concentración de ácidos. Además, se debe tener en cuenta que es recomendable empezar en una temperatura, al menos, 18°C menor que la de inflamación (UNE, 1978). Tras una primera prueba con la muestra de aceite 1, hasta 181°C, no se detecta el punto de inflamación. Según una hoja de seguridad sobre el aceite de salmón, que también es un pescado graso, la temperatura de inflamación es mayor a 177°C, por lo que para el bocarte debería ser similar (Trade Chemicals Ltd, n.d.). Por lo tanto, se prueba a incrementar la temperatura inicial. Se aprecian chispas al introducirse la llama pero no detecta ningún punto de inflamación. Debido a que el modo rampa no permite modificar el tamaño de la muestra (está fijado en 2 ml), se prueba a realizar el análisis en el modo equilibrio, que permite medir automáticamente el peso de la muestra introducida.

Se selecciona el modo equilibrio con una temperatura inicial de 160°C, incrementándola cada vez en 5°C hasta la detección. Debido al poco volumen de muestra disponible, el equipo no es capaz de llegar a un resultado, por lo que se utiliza

la **muestra de aceite número 2**. En este caso, la temperatura de inflamación es de **205°C**.

4 CONCLUSIONES

Se ha puesto en marcha un proceso de extracción de aceite a partir de bocarte a escala de laboratorio, en el cual se ha determinado que el prensado automático es más adecuado que el prensado manual. Este enfoque ha revelado varias facetas importantes sobre la optimización del proceso y los factores que influyen en la calidad del aceite extraído.

Durante la realización de los experimentos, se ha comprobado que la centrifugación directa de las muestras no es efectiva para la extracción del aceite de bocarte. En cambio, es necesaria una extracción líquido-líquido debido a la presencia de proteínas y otras materias orgánicas no solubles en el aceite. La fabricación de biodiésel requiere de imprescindibles técnicas de purificación en varias de sus etapas, por lo que la adición de hexano para la correcta extracción del aceite no supone un proceso adicional ni excesivo dentro del proyecto.

Otro aspecto relevante del estudio consiste en la cocción del pescado previa al prensado. Aunque la cocción ayuda a coagular las proteínas, facilitando teóricamente la extracción del aceite, esta propiedad no resulta tan crucial debido a la necesidad de utilizar hexano durante el proceso. Además, se ha observado que las muestras obtenidas mediante prensado sin cocción previa son más abundantes. Esto se debe a que, durante la cocción, se obtiene un líquido cuyas propiedades son muy diferentes a las del obtenido mediante el prensado. El líquido de cocción adquiere una mayor cantidad de triglicéridos saturados que hacen que la densidad del aceite que se extrae de él sea más elevada (Bako et al., 2018), mientras que la del aceite obtenido a partir del líquido de prensado resulta más baja de lo esperado. Esto ocurre con la muestra 1 y, especialmente, con la 3, ya que presenta una densidad aún más baja, lo que podría atribuirse al prensado manual. Por lo tanto, sería recomendable realizar un prensado sin aplicar temperatura adicional, ya que el uso de calor puede tener efectos similares a los de la cocción. Para ello, lo preferible es utilizar maquinaria industrial,

ya que, a escala de laboratorio, existe el riesgo de obstruir la maquinaria debido su tamaño, diseño y carácter económico.

Todos estos hechos apuntan a la ventaja que supone no cocer el pescado. Sin embargo, existe una muy posible razón por la que si hacerlo: ayudar a reducir el contenido en ácidos docosaheptaenoicos (DHA) (Chantachum et al., 2000)). Se trata de un tipo de ácido graso poliinsaturado que presenta una mayor susceptibilidad a la oxidación, siendo perjudicial para el biodiésel (Pullen & Saeed, 2014). No obstante, no siempre resulta necesario eliminarlos, ya que, debido a las propiedades de cada pescado, pueden llegar a estabilizarse oxidativamente con otros ácidos. Para conocer la estabilidad oxidativa de un determinado aceite, podría llevarse a cabo una prueba de Rancimat (Amruth & Sudev, 2024).

Teniendo todo en cuenta, no cocer el pescado sigue siendo la opción más viable, ya que, además de simplificar el proceso a gran escala, se ha comprobado que tiene una mayor eficiencia de extracción de aceite que otros métodos, aunque no se hayan alcanzado todos los valores deseados. Además, es el único aceite que, sin tener en cuenta un margen de error, se encuentra dentro de los límites naturales del índice de yodo, con un valor de 110, y dentro del límite requerido para el biodiésel (120) (UNE, 2018a). El experimento 1 muestra un rendimiento inferior al del experimento 2 en todos estos aspectos. Sin embargo, su desempeño es significativamente mejor que el del experimento 3. Por lo tanto, se concluye que el experimento 3 es el menos indicado y eficiente debido al uso del prensado manual.

A pesar de que el contenido en acidez de las muestras de aceite se encuentra dentro de los límites, el índice de acidez es elevado, por lo que no cumplen con los estándares de calidad para la producción de biodiésel. El experimento número 2 es el más representativo de la naturaleza del bocarte, ya que da lugar a un aceite con alto contenido en ácidos grasos libres, lo que requiere un mayor pretratamiento para evitar la formación de jabones durante la producción de biodiésel (Alvarado-Ramírez et al., 2022).

El contenido de agua, por su parte, también es elevado. Sin embargo, procesos de clarificación y filtrado pueden reducir la humedad en más de la mitad, como se ha observado en estudios con tilapia del Nilo y sorubim híbrido (Menegazzo et al., 2014).

Alternativamente, se podrían considerar métodos de secado mediante agitación o el uso de desecantes químicos para absorber el agua. En caso de ser necesario, podría optarse por una esterificación ácida para reducir los ácidos grasos libres y evitar la formación de jabones, ayudando a eliminar el contenido en agua.

Considerando todos los resultados de la caracterización del aceite de bocarte, la decisión de cocer o no el pescado antes del prensado se fundamenta principalmente en una evaluación técnica y económica. Por un lado, la cocción del pescado produce un menor índice de acidez y un menor contenido en agua. Por otro lado, no cocer el pescado permite obtener una mayor cantidad de aceite extraído, una mayor densidad, acorde con lo esperado, y un índice de yodo ligeramente mejor.

Para la obtención de biodiésel, siempre es necesario un pretratamiento del aceite. En el caso de una producción catalizada por ácido, la opción de no cocer el pescado es más adecuada debido a la mayor cantidad de aceite disponible. Sin embargo, para una producción básica, que es la más común en la industria, es preferible cocer el pescado porque requiere menos pretratamiento.

Finalmente, con vistas a la continuación del proyecto, se recomienda escalar el proceso a mayores volúmenes. Esto permitirá evaluar la temperatura de inflamación del aceite obtenido en el experimento 1 y explorar la posible correlación entre las temperaturas de inflamación y las densidades obtenidas, lo cual podría estar directamente relacionado con la menor cantidad de ácidos grasos libres presente en las muestras sometidas a cocción. Este análisis proporcionará una comprensión más precisa de las ventajas de cocer frente a no cocer el pescado. Según los resultados obtenidos hasta ahora, la decisión entre ambos métodos se fundamenta, principalmente, en una evaluación técnica y económica. No obstante, si se confirmara que el experimento 1 resulta ser la opción más eficiente, sería aconsejable realizar también el experimento 2 sin aplicar temperatura durante el prensado para verificar de manera concluyente que el método del experimento 1 es el más adecuado. Adicionalmente, resultaría interesante realizar una cromatografía de gases, ya que es una técnica particularmente útil para la caracterización de aceites y FAMES debido a su capacidad para separar componentes en una mezcla compleja.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Sinc. (2020). Un biodiésel fabricado con restos de comida. *Agencia Sinc.*
<https://www.agenciasinc.es/Noticias/Un-biodiesel-fabricado-con-restos-de-comida>
- Alvarado-Ramírez, L., Santiesteban-Romero, B., Poss, G., Sosa-Hernández, J. E., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldívar, R., Bonaccorso, A. D., & Melchor-Martínez, E. M. (2022). Sustainable production of biofuels and bioderivatives from aquaculture and marine waste. *Frontiers in Chemical Engineering*, 4. <https://doi.org/10.3389/fceng.2022.1072761>
- Álvarez García, A. (2023). *PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE ACEITE DE DESECHOS DE PESCADO.*
- Amazon. (n.d.-a). *Prensa automática de aceite Moongiantgo de 820W*. Retrieved July 16, 2024, from <https://www.amazon.es/Moongiantgo-Autom%C3%A1tico-Calentador-Inteligente-Alimenticio/dp/B0B6QVN594?th=1>
- Amazon. (n.d.-b). *Prensa manual Pavi Craft Brew*. Retrieved July 16, 2024, from <https://www.amazon.es/alimentos-aluminio-fundido-recuperador-inoxidable/dp/B00K6OSUDO>
- Amruth, E., & Sudev, L. J. (2024). Ageing effect and storage stability of fish biodiesel and its blends with diesel treated with orange peel extract as economical green-antioxidant additive. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 41(1), 339–346. <https://doi.org/10.1007/s43153-023-00327-w>
- Babderra, B., Vázquez, R., Martínez, M., & José, A. (2016). Effect of free fatty acids contents on biodiesel quality. Pilot plant studies. *Fuel*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.01.018>
- Bako, T., Umogbai, V. I., & Awulu, J. O. (2017). *Criteria for the extraction of fish oil* (Vol. 19, Issue 3). <http://www.cigrjournal.org>
- Bako, T., Umogbai, V. I., & Awulu, J. O. (2018). Effects of heat treatment on fish oil extraction process using a single screw expeller. *Journal of Postharvest Technology*, 06(4), 116–125. <http://www.jpht.info>
- Bohlmann, A., & Salinas, C. (2013, January 15). *Producir biodiésel de escamas y aletas de pescado.* <https://www.dw.com/es/producir-biodi%C3%A9sel-de-escamas-y-aletas-de-pescado/a-16523173>
- Bonilla-Mendez, J. R., & Hoyos-Concha, J. L. (2018). Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(3), 645–668. https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num2_art:684

- Carmona-Cabello, M., Sáez-Bastante, J., Pinzi, S., & Dorado, M. P. (2019). Optimization of solid food waste oil biodiesel by ultrasound-assisted transesterification. *Fuel*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115817>
- Cecotec. (n.d.). *Cecotec Juice&Live 2000 Easyclean Instruction Manual*.
- Chantachum, S., Benjakul, S., & Sriwirat, N. (2000). Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry*, 69(3), 289–294. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00266-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00266-6)
- del Portillo Valdés, L., Sala Lizarraga, J. M., & Millán García, J. A. (2011). *Energía sostenible frente al cambio climático*. (López & Da Vinci & Universidad del País Vasco, Eds.).
- Dunford, N., TEMELLI, F., & LeBLANC, E. (2006). Supercritical CO₂ Extraction of Oil and Residual Proteins from Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) as Affected by Moisture Content. *Journal of Food Science*, 62, 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03987.x>
- Dwivedi, D., Agarwal, A. K., & Sharma, M. (2006). Particulate emission characterization of a biodiesel vs diesel-fuelled compression ignition transport engine: A comparative study. *Atmospheric Environment*, 40(29), 5586–5595. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.05.005>
- FITSA, & IDAE. (2008). *Nuevos combustibles y tecnologías de propulsión: Situación y perspectivas para automoción*.
- Flottweg. (n.d.). *Centrifugadora*. Retrieved February 17, 2024, from <https://www.flottweg.com/es/la-gama-de-productos/centrifugas/>
- Gobierno de Cantabria. (2022). BOC 2022-2950. *BOC*, 80.
- Haarslev. (n.d.). *Prensa de doble tornillo*. Retrieved February 17, 2024, from <https://es.haarslev.com/products/twin-screw-press/>
- Interempresas. (2015). Investigadores estudian las propiedades del biodiésel de aceite de pescado. *Interempresas*. <https://www.interempresas.net/Energia/Articulos/134925-Investigadores-estudian-las-propiedades-del-biodiesel-de-aceite-de-pescado.html>
- Javier, A. ;, Martín, L., Margallo, M., Israel, B., & Salmón, R. (n.d.). *ANÁLISIS DEL CICLO DE VIDA DE LA PESCA DE LA SARDINA EN CANTABRIA*.
- Jayasinghe, P., & Hawboldt, K. (2012). A review of bio-oils from waste biomass: Focus on fish processing waste. *Renewable & Sustainable Energy Reviews - RENEW SUSTAIN ENERGY REV*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.005>
- Llerena Daza, T. E., & Aranda Pariasca, D. M. (2017). Extracción y caracterización del aceite crudo obtenido de un hidrolizado enzimático de residuos frescos de anchoveta (*Engraulis ringens*). *Anales Científicos*, 78(1), 34. <https://doi.org/10.21704/ac.v78i1.858>

- Mathew, S. (2013). Chemical composition and nutritional value of Anchovy (*Stolephorus commersonii*) caught from Kerala coast. In *India. Article in European Journal of Experimental Biology*. www.pelagiaresearchlibrary.com
- Menegazzo, M. L., Franco Lucas, B., Boarin Alcade, L., Petenucci, M. E., & Graciano Fonseca, G. (2015). Production of biodiesel via methyl and ethyl routes from Nile tilapia and hybrid Sorubim crude oils. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.011>
- Menegazzo, M. L., Petenucci, M. E., & Fonseca, G. G. (2014). Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. *Food Chemistry*, 157, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.121>
- Menéndez, J. L. (2014, May 12). *Propiedades de las proteínas*. Asturnatura. <https://www.asturnatura.com/temarios/biologia/proteinas/propiedades-de-las-proteinas>
- Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, G. de E. (2024, June 10). *Registro de Flota*. <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/registro-flota/>
- Moffat, C. F., McGill, A. S., Hardy, R., & Anderson, R. S. (1993). The production of fish oils enriched in polyunsaturated fatty acid-containing triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(2), 133–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02542615>
- Nordregio. (n.d.). *Generating biodiesel from fish waste in Åland*. Retrieved December 20, 2023, from <https://archive.nordregio.se/en/Publications/Publications-2016/GREEN-GROWTH-IN-NORDIC-REGIONS-50-ways-to-make-/Clean-tech-and-renewable-energy--/Gener/index.html>
- Oil Skimmers, Inc. (n.d.). *Decanter*. Retrieved February 17, 2024, from <https://www.oilskim.com/img/spanish/Decanter-Color.jpg>
- Ortiz, S. (2023). *Elaboración de harina de pescado*. <http://hdl.handle.net/1834/4068>
- Orto Alresa. (n.d.). *Catalogo de serie Digicen 21 ESP*.
- Pullen, J., & Saeed, K. (2014). Experimental study of the factors affecting the oxidation stability of biodiesel FAME fuels. *Fuel Processing Technology*, 125, 223–235. <https://doi.org/10.1016/J.FUPROC.2014.03.032>
- RETEMA. (2021, February 1). *La industria pesquera de la UE produce 5,2 millones de toneladas de residuos anuales*. <https://www.retema.es/actualidad/industria-pesquera-ue-produce-52-millones-toneladas-residuos-anuales>
- Rico, J. (2015). *Biodiésel más efectivo a partir de una mezcla de aceites de pescado y de fritura*.
- Russell Hobbs. (n.d.). *Russell Hobbs 19270-56 71091X Instruction Manual*.

- SELECTA sau, J. (n.d.). *DRYGLASS 2000381 ESTUFA PARA SECAR VIDRIO GLASS DRYING OVEN*. <http://www.jpselecta.es>
- Solen, K. A., & Harb, J. N. (2011). *Introduction to Chemical Engineering* (5th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Tobalina, B. (2013, February 11). *Biodiésel de vísceras de pescado*. <https://www.larazon.es/verde/biodiesel-de-visceras-de-pescado-1-BC1040762/>
- Towler, G., Sinnott, R., Boston, A. •, Heidelberg, •, London, •, San, P. •, San, D., Singapore, F. •, & Tokyo, S. •. (2008). *CHEMICAL ENGINEERING DESIGN Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design*. <http://elsevier.com>
- Trade Chemicals Ltd. (n.d.). *MSDS: Salmon Fish Oil Section*.
- UNE. (1973). *UNE 55-105-73 Determinación de la viscosidad en materias grasas*.
- UNE. (1978). *UNE 55-103-78 Materias grasas. Temperatura de inflamación*.
- UNE. (2000a). *UNE 84152 Preparación de muestras de ensayo de aceites esenciales*.
- UNE. (2000b). *UNE 84156 Determinación de la densidad relativa a 20°C*.
- UNE. (2017a). *ISO 8534:2017 Determinación del contenido en agua en aceites y grasas por el método de Karl Fischer*.
- UNE. (2017b). *UNE-EN ISO 2719:2017 Determinación del punto de inflamación*.
- UNE. (2018a). *UNE EN 14214=2013 V2+A1 Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diésel y equipos de calefacción*.
- UNE. (2018b). *UNE-EN 14214:2013 V2+A1*.
- UNE. (2019). *ISO 3961:2018 Determinación del índice de yodo en aceites y grasas animales y vegetales*.
- UNE. (2021). *ISO 660:2020 Determinación del índice de acidez y de la acidez en aceites y grasas animales y vegetales*.
- Unfccc. (2015). *Paris Agreement*.
- Valenzuela B., A., Sanhueza C., J., & de la Barra D., F. (2012). El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(2).
- Vipe Fuels. (2024). *Venta de Biodiésel B10, B30 y B100*. <https://vipefuels.com/biodiesel-b10-b30-y-b100/>

ANEXO 1

**BASE DE DATOS SOBRE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE
PARA BIODIÉSEL**

La Tabla 1a contiene la base de datos con la información recopilada.

Tabla 1a. Base de datos sobre la extracción del aceite

Autor y año	Preparación	Materia prima	Cocción	Pre-estruje	Prensado	Centrífuga	Clarificación	Caracterización	
Silva Ortiz 2023	---	---	95 - 100 °C 15-20 min	Separan el líquido	Prensa de tornillo o doble tornillo	3000 rpm 2-4 seg	95 °C Mezcla con agua Centrífuga	---	
Tanko Bako 2014	Quitar órganos internos, lavar sangre, cortar en piezas pequeñas	Caballa (scomber scombrus)	95 - 100 °C 10-20 min	Separan el líquido	Prensa de tornillo	Decantación y tamizado con calor	70 °C	Rendimiento extracción, color, índice refractivo, FFA, Saponificación, Yodo, Peróxido	Siguiendo pasos de: American Oil Chemists Society (1998)
Tanko Bako 2017	Descongelar, quitar órganos internos, lavar sangre, cortar en piezas pequeñas	Caballa (scomber scombrus)	60 - 90 °C 5-20 min	Separan el líquido	Prensa de tornillo	Decantación y tamizado con calor	Sí	Rendimiento, Color, gravedad específica, índice refractivo, FFA, Saponificación, Yodo, Peróxido, Materia insaponificable	
Tanko Bako 2018	Descongelar, quitar órganos internos, lavar sangre, cortar en piezas pequeñas	---	60 - 90 °C 5-20 min	Separan el líquido	Prensa de tornillo (50,60,70 rpm)	Decantación y tamizado con calor	Sí	---	
Suganya Chantachum 1999	Descongelar a 4°C	Cabezas de Atún (Thunnus)	85 °C 30 min	Separan el líquido	Prensa hidráulica (140 tons/m2)	9600xg at 4°C for 20 min	---	Rendimiento, Color, FFA, Saponificación, Yodo, Peróxido, Materia insaponificable, Fatty Acid profile,	
Sujjat Al Azad 2019	Lavado con agua destilada para remover suciedad y sangre	Órganos internos, vísceras, huesos, recortes, colas, aletas y piel de pescado fresco	55-60 °C Hasta secado	---	Mortero 60°C	---	---	Acid value, FFA, Fatty Acid Profile, Lípidos crudos	

Autor y año	Preparación	Materia prima	Cocción	Pre-estruje	Prensado	Centrífuga	Clarificación	Caracterización
Valeria Crexi 2010	Descongelar a temperatura ambiente y desmenuzar con amoladora	Vísceras de Carpa (Cyprinus carpio)	95-100 °C 30 min	Tamizado para separar espinas y escamas	---	Sí	---	Fatty Acid Profile, Lípidos classes
Wu y Bechtel 2008	Almacenar fresco hasta 4 días a 15°C	Cabezas y vísceras de Salmón Rosado (Oncorhynchus gorbuscha)	95 °C 15 min (Baño en agua y agitación constante)	---	---	2250g for 15 min	---	FFA, Fatty Acid Profile, Actividad Antioxidante
Shuxian Hao 2015	Lavados y secados en desecador	Esturión (Acipenseridae)	85 °C 60 min (Removido cada 15 min)	---	---	5000g for 10 min at 4°C	---	Ratio extracción, Peróxido, Ácido, Color, Thiobarbituric acid reactive substances, Compuestos volátiles, Fatty Acid, Estabilidad oxidativa
Mariana Lara Menegazzo 2014	Destripado y fileteado en fábrica, deshuesados en laboratorio	Tilapia del Nilo (Oreochromis niloticus) y Sorubim híbrido (Pseudoplatystoma corruscans × P. fasciatum)	40 °C 180 min (en baño de agua)	Separan el líquido	---	3 ciclos de 5 min a 7°C y 220rpm	Sí	Índice Acidez, Índice de Refracción, Peróxido, Saponificación, Yodo, Densidad, Humedad, Lípidos, FAME
Chakraborty y Joseph 2015	Desmenuzado y mezclado con agua desionizada (100g con 100mL)	Sardina (Sardinella longiceps)	75 °C 30 min	Centrifugado a 8000g 30 min	Prensa de tornillo	8000g 30 min	---	Oxidación, Lípidos
Ribeiro, Oliveira, Bechtel y Prentice 2013	Se homogeneizan en mezcladora a 21000rpm durante 2 min	Abadejo de Alaska (Theragra chalcogramma)	50-60 °C 15-30 min (agitación constante a 4500rpm)	Centrifugado a 7500g 30 min (2 veces)	---	85°C	---	FFA, Lípidos, Fatty Acids
Agnieszka Glowacz 2016	Desmenuzado en amoladora. Mezcla con agua a 50°C durante 5 min	Pielés, cabezas y espinas	95 °C 30 min	---	---	8000g 10 min	---	Fatty Acids

La Tabla 2a, por su parte, resume las etapas y condiciones más favorables para el diseño de un proceso de obtención de aceite de pescado a escala de laboratorio para su posterior utilización en la fabricación de biodiésel. Además, a la hora de realizar el diseño, se han tenido en cuenta equipos fácilmente escalables para su posterior uso local en las zonas pesqueras de Cantabria.

Tabla 2a. Etapas de la extracción y condiciones de contorno

PRECOCCIÓN	COCCIÓN	PRE ESTRUJE	ESTRUJE	CENTRIFUGADO
Lavado con agua destilada, para limpiar la sangre y otros residuos	Se realiza en un rango de temperaturas de 90-100°C	Se separan los sólidos del líquido obtenido durante la cocción	Prensado húmedo	La aceleración que se aplica a la muestra es de 8000g (de fuerza)
En ocasiones, se desmenuza la materia prima con una amoladora y se mezcla la materia con distintas concentraciones de agua	La duración se encuentra entre 15-30 minutos			El rango de tiempo es de 10-30 minutos

Con base en estos datos, se deciden las condiciones de contorno ideales para realizar el diseño de los experimentos.

ANEXO 2
DISEÑO INICIAL DE EXPERIMENTOS

DISEÑO DE EXPERIMENTOS

La idea inicial para el diseño de los experimentos del proceso de obtención del aceite, para este estudio concreto y considerando las especificaciones de los equipos disponibles en relación con las condiciones de contorno ideales previamente definidas (95°C durante 15-30 minutos para la cocción y un centrifugado con una aceleración de 8000g durante 10-30 minutos.), se recoge en la Tabla 1b.

El diseño de los experimentos está centrado en algunas de las variables que pueden ser modificadas con total libertad. La primera, se centra en determinar la influencia que tiene trocear el pescado antes de la cocción sobre la caracterización del aceite. Por eso, los experimentos se dividen en dos grupos: cocción con muestras troceadas y cocción con muestras sin trocear.

Por otro lado, según lo visto en otros estudios, el tiempo de cocción óptimo suele encontrarse cerca de los 30 minutos. Sin embargo, para la realización de estos dos tipos de experimentos, se ha considerado una amplia diferencia en el tiempo de cocción de las muestras, con el objetivo de determinar su influencia sobre los resultados. De esta manera, en el caso de encontrarse una alta disparidad entre estos, podría volver a realizarse otra serie de experimentos utilizando un tiempo intermedio (35 minutos), más cercano a los 30 minutos.

Cada tipo de experimento debe realizarse **tres veces** debido a la variabilidad de las muestras.

Tabla 1b. Tabla de experimentos del diseño inicial

Número de experimento	Troceado (Sí/No)	Tiempo de cocción (min)
1	No	10
2	No	10
3	No	10
4	No	60
5	No	60

6	No	60
7	Sí	10
8	Sí	10
9	Sí	10
10	Sí	60
11	Sí	60
12	Sí	60

PREPARACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

La preparación está basada en el diseño inicial de los experimentos.

En este caso, la selección se fundamenta en dos decisiones principales: (i) la primera, consiste en comenzar por los experimentos con muestras troceadas, ya que, en teoría, son más fáciles de prensar en la licuadora; mientras que, (ii) la segunda decisión, radica en realizar primero los experimentos que requieren un tiempo de cocción de la muestra de 10 minutos, dada la necesidad de familiarizarse con el proceso, acotando así su duración total y ayudando a identificar y corregir los posibles fallos que puedan presentarse con la mayor brevedad de tiempo posible.

Por lo tanto, el procedimiento se basa en el estudio de las muestras troceadas y sin trocear, respectivamente, con 10 minutos de cocción y, finalmente, con 60 minutos de cocción.

Una vez tomadas estas decisiones, se procede a pesar la cantidad de bocartes disponible, que es de 10 kg. Como se desea realizar un total de 12 experimentos, se divide el peso entre cada uno de ellos. De esta manera, se decide tomar muestras de aproximadamente 800 gramos. Una vez establecido el peso destinado a cada experimento, se congelan bolsas con la cantidad aproximada a -18°C . Posteriormente, deben descongelarse a 4°C durante el día previo a la realización del experimento.