

PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLICERINA CRUDA Y ADAPTACIÓN DEL MÉTODO ASTM D6584 PARA LA DETERMINACIÓN DE GLICERINA EN BIODIESEL

Diana Robles Chaves¹ y Javier Quesada Espinoza^{1}.*

¹Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San Jose, Costa Rica.

Recibido 19 de mayo 2013; aceptado 30 noviembre 2013

Abstract

In this paper an analytical method is validated for the purification and quantification of the content of glycerol in samples of crude oil from the production of biodiesel fuel. We compared the purity of the glycerol present in the crude oil directly with the purity obtained after purification. The analytical parameters evaluated were precision and recovery. We validated also the method to determine the free and total glycerol in samples of biodiesel fuel with a gas chromatograph according to standard ASTM D6584. The linear working areas, the detection and quantitation limits, the sensitivity of calibration and the precision in terms of repeatability were determined for glycerol, monoolein, diolein and triolein, and the accuracy for glycerol. Biodiesel fuel in two batches was analyzed; the content of glycerol in both batches exceeded the fraction of total glycerol allowed according to a Central American Technical Regulation, and one batch exceeded the fraction of free glycerol.

Resumen

Se validó la metodología analítica para la purificación y cuantificación del contenido de glicerina en muestras de crudo provenientes del proceso de producción de biodiesel. Se comparó la pureza de la glicerina presente directamente en el crudo con la pureza obtenida luego del proceso de purificación. Los parámetros analíticos evaluados fueron: precisión y recuperación. La metodología por cromatografía de gases con base en el método estándar ASTM D6584 se validó para la cuantificación de glicerina libre y total en muestras de biodiesel. Los ámbitos lineales de trabajo, los límites de detección y cuantificación, la sensibilidad de calibración y la precisión en términos de repetibilidad para la glicerina, monooleína, dioleína y trioleína; y la veracidad para la glicerina se determinación. Además, dos lotes de biodiesel se analizaron, encontrando que ambos incumplen el porcentaje de glicerina total permitido por el Reglamento Técnico Centroamericano y uno de ellos el porcentaje de glicerina libre.

Key words: Glycerin, biodiesel, gas chromatography, purification, ASTM D6584.

Palabras clave: Glicerina, biodiesel, cromatografía de gases, purificación, ASTM D6584.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de energía renovable ha aumentado rápidamente en los últimos años, debido al encarecimiento en los combustibles de origen fósil, así como al aumento de la demanda energética y las políticas de subvención pública adoptadas por los distintos países. Dentro de las fuentes más comunes de este tipo de energía se encuentra el denominado biodiesel. La ASTM

* Autor para correspondencia: francisco.quesada@ucr.ac.cr

(American Society for Testing and Materials) define el término biodiesel como una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga que se derivan de aceites vegetales o grasas animales.

El proceso utilizado para la elaboración de biodiesel es la transesterificación. Ella comprende una secuencia de tres reacciones, donde una molécula de triacilglicerol contenida en el aceite vegetal reacciona con tres moléculas de alcohol (generalmente metanol), degradándose primero a diacilglicerol, luego a monoacilglicerol y finalmente en glicerina; en cada una de estas etapas se genera una molécula de éster metílico (biodiesel). La glicerina producida puede ser purificada y utilizada en varias aplicaciones como en la producción de explosivos (dinamita, nitroglicerina), en formulaciones farmacéuticas y cosméticas. Ella se emplea para mejorar la suavidad, proporcionando lubricación y también como humectante, por lo que se puede encontrar en muchos productos cosméticos como en acondicionadores para el cabello.

Dado que la calidad del biodiesel debe regularse, se han establecido diferentes normas con especificaciones particulares, por ejemplo en EEUU se establece la norma ASTM D 6751 y en Europa la EN 14214. Para el caso de los países miembros de la región centroamericana como Costa Rica se establece el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 75.02.43:06), el cual detalla las características físico químicas que debe cumplir el biodiesel utilizado al 100 % (B100) y sus mezclas con combustible diesel para ser utilizado o comercializado como carburante. En este se establece un contenido máximo de glicerina libre y glicerina total.

Niveles bajos de glicerina total aseguran una alta conversión del aceite o de la grasa hacia sus mono-alquil-ésteres. La cantidad de glicerina libre depende del proceso de producción. Un valor alto indica una mala decantación y lavado del biodiesel y provoca incremento en las emisiones de aldehídos y acroleínas. Niveles altos de glicerina aumentan la viscosidad del biodiesel y pueden causar problemas de depósitos en el inyector, así como colmatación de filtros y afectar adversamente las propiedades del combustible a bajas temperaturas. A temperaturas altas se genera una mala combustión.

En el presente trabajo se implementó un método para cuantificar el contenido de glicerina total y libre en biodiesel por cromatografía de gases y se desarrolló una metodología para determinar la pureza de glicerina cruda por volumetría.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La sección experimental de este trabajo se dividió en dos partes principales: la purificación y cuantificación del crudo de glicerina y la cuantificación de la glicerina total y libre en el biodiesel. El crudo de glicerina y el biodiesel utilizado fueron suministrados por una empresa nacional.

Purificación de glicerina

Proceso para la purificación de la glicerina en el crudo

Se colocó una masa exacta de la muestra de crudo de glicerina en un balón de fondo plano y se evaporó el exceso de metanol a 75 °C empleando un rotavapor. Una vez eliminado el metanol, se colocó la muestra caliente en un vaso de precipitados, donde se calentó a 60 °C sobre una plantilla de agitación. El pH de la disolución se ajustó a 3,0 con una disolución de 3 mol/L y la muestra se colocó en un embudo separador, donde se observó la formación de dos fases, la superior es la fase orgánica compuesta de jabones y la inferior es la fase acuosa donde se encuentra la glicerina.

La fase acuosa se recolectó en un vaso de precipitados de 250 mL y se le adicionaron 20 mL de EtOH al 95 %, lo cual generó la precipitación de algunas sales. Posteriormente se filtró por

gravidad empleando papel filtro Whatman #4 y se realizaron varios lavados con porciones de 10 mL de etanol para evitar que la muestra quedara retenida en las sales.

Por último, la muestra se neutralizó a pH 7,0 con NaOH 4 mol/L, y se colocó en una estufa a 90 °C para eliminar la mayor cantidad posible de agua y etanol.

Cuantificación volumétrica de glicerina

Para la cuantificación del contenido de glicerina en las muestras de crudo, se aplicó el método ASTM D7637, sin efectuar modificaciones.

Validación del método de purificación y de cuantificación volumétrica de la glicerina en el crudo

Para validar el procedimiento de purificación de la glicerina fue necesario realizar una normalización de todas las etapas del procedimiento descrito. Además se realizaron estudios de recuperación, en los cuales se adicionó una cantidad conocida de glicerina pura (J.T Baker 99,8 %. Lote: J20C58) a las muestras de crudo antes de realizar el procedimiento de purificación. Esto se llevó a cabo en tres ocasiones diferentes. A cada muestra de crudo se le adicionaron un 30 % de glicerina pura, y posteriormente se realizó la purificación y se determinó si en el método se presentaban pérdidas de muestra durante el proceso.

Se determinó la repetibilidad del método volumétrico, para lo cual se valoraron 7 réplicas de la muestra de glicerina pura bajo las mismas condiciones. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Glicerina total y libre en biodiesel

Cuantificación de la glicerina total y libre en el biodiesel por cromatografía de gases

Se aplicó el método ASTM D6584. Un cromatógrafo de gases marca HP 5890 serie II se utilizó para realizar las mediciones. La columna empleada fue una capilar marca Zebron de 15 m de longitud con un diámetro interno de 0,32 mm y 0,1 µm de espesor de película, y una pre-columna de la misma marca de 5 m de longitud y 0,53 mm de diámetro.

Las curvas de calibración para cada compuesto se prepararon a partir de los siguientes materiales estándar: glicerina 500 µg/mL Lote LB80918, monooleína 5000 µg/mL Lote LB81608, dioleína 5000 µg/mL Lote LB81502 y trioleína 5000 µg/mL Lote LB82874. Como estándares internos se utilizaron (S)-(-)-1,2,4- butanotriol Lote 05218LE y tridecanoato de glicerol (tricaprin) Lote 040M5203V, todos en piridina como disolvente de la casa Sigma Aldrich.

Para la glicerina, monooleína y dioleína se prepararon cinco patrones, mientras que para la trioleína se prepararon 10 patrones. Para todos los patrones se utilizó la misma cantidad de estándar interno.

Fue necesario ampliar el ámbito de trabajo para la trioleína a (0,35 – 1,65) mg, debido al exceso de triacilglicerol presentes en las muestras de biodiesel.

Las modificaciones realizadas a este método consisten en utilizar un inyector split/splitless en vez de un sistema de inyección on-column, por lo que se utilizó una jeringa de inyección con una aguja de 12,5 cm de largo, con el fin de lograr una inyección dentro de la pre-columna.

Se analizó el contenido de glicerina libre y total en dos muestras de biodiesel, identificadas como lote A y lote B. Para ello, se midió una masa de 100 mg de muestra de biodiesel en balanza analítica directamente en un vial. Con una jeringa se adicionó 100 µL de cada uno de los estándares internos y 100 µL de MSTFA (metil éster de ácidos grasos). El vial se agitó y se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionaron 8 mL de heptano y nuevamente se agitó.

Las muestras y patrones se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del análisis, ya que las concentraciones son muy bajas y las disoluciones se efectuaron con heptano y piridina, cuya volatilidad es significativa.

Validación del método cromatográfico

El ámbito de trabajo seleccionado para la glicerina, monooleína y dioleína fue el recomendado en el método ASTM D6584. Para el caso de la trioleína fue necesario expandir el ámbito de trabajo.

Se prepararon dos curvas de calibración con cinco patrones para cada compuesto, las cuales se leyeron en tres días diferentes y se realizó una doble lectura de cada patrón por día. Únicamente para la trioleína los patrones de las dos curvas no se prepararon a las mismas concentraciones.

El estudio de linealidad se llevó a cabo, mediante la elaboración de curvas de calibración por regresión lineal no ponderada, así como el análisis del coeficiente de correlación (R^2), el criterio de F_{ANDEVA} y residuales.

Empleando el programa Minitab 15, se realizó la prueba de Levene y la prueba de Bartlett para determinar si existen diferencias entre las varianzas. Para establecer cuál de estas pruebas presenta mayor potencia estadística se realizaron también pruebas de normalidad con el programa Minitab: Anderson-Darling y Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk).

El límite de detección y límite de cuantificación se determinaron según lo recomendado por Miller-Miller, 2002 el cual utiliza la curva de calibración y los límites de confianza al 95 %. Ellos se calcularon como la desviación estándar del blanco dividida entre la pendiente: este factor multiplicado por tres para el de detección y por 10 para el de cuantificación.

Por otra parte, se emplearon las curvas de linealidad para calcular la sensibilidad de calibración, ya que esta corresponde a la pendiente. El cálculo de la sensibilidad analítica se llevó a cabo a tres niveles diferentes de concentración para cada compuesto, a un nivel bajo, intermedio y alto de concentración.

La precisión bajo condiciones de repetibilidad se determinó midiendo un mismo patrón en seis ocasiones y calculando la desviación estándar y el coeficiente de variación. Esto se llevó a cabo a tres niveles de concentración diferentes para cada compuesto. El caso de la trioleína fue diferente, ya que se realizaron cuatro lecturas de cada patrón en vez de seis.

Por último, la veracidad se evaluó mediante un estudio de recuperación, donde se enriqueció una muestra de biodiesel con glicerina estándar, por triplicado. Se trató la muestra de biodiesel tal como se describe en el apartado “cuantificación de la glicerina total y libre en el biodiesel por cromatografía de gases”, con la modificación de que se adicionó una cantidad conocida de glicerina estándar antes de agregar el MSTFA. El porcentaje de recuperación se estimó según la ecuación 1.

$$\%R = \frac{(C_{\text{exp}} - C_{\text{org}})}{(C_{\text{teórica}} - C_{\text{org}})} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crudo de glicerina

Se purificaron dos muestras de crudo de glicerina (lote 1 y lote 2) empleando el método descrito en la materiales y métodos. La validación de esta metodología se realizó con la evaluación de los parámetros de repetibilidad y porcentaje de recuperación.

Cuantificación de glicerina

La cuantificación volumétrica de glicerina se realizó en dos lotes de crudo directamente, y posteriormente en estos mismos lotes luego del proceso de purificación; con el fin de conocer la pureza alcanzada con este proceso. Estas determinaciones se hicieron en cuatro ocasiones diferentes para el lote 1 y lote 2. Los resultados obtenidos se muestran del Cuadro I y II.

CUADRO I. Porcentaje de glicerina obtenido en varias réplicas para el lote 1.

	% Glicerina inicial	% Glicerina purificada
Promedio	27,4	84,8
Desviación estándar	2,4	8,5
Porcentaje CV	8,8	10,1

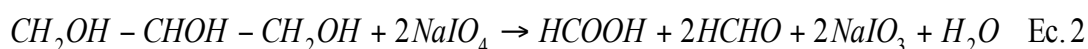
CUADRO II. Porcentaje de glicerina obtenido en varias réplicas para el lote 2.

	% Glicerina inicial	% Glicerina purificada
Promedio	29,6	84,5
Desviación estándar	3,6	8,1
Porcentaje CV	12,2	9,6

Este estudio confirma el incremento en la pureza de la glicerina luego de realizar el proceso de purificación. Los porcentajes de glicerina obtenidos inicialmente concuerdan con los esperados para una glicerina obtenida de la producción de biodiesel a partir de aceites usados, la cual corresponde a valores entre un (25 – 40) %.

En este caso el coeficiente de variación (CV) puede ser un mejor indicador de la precisión del análisis ya que es independiente de la concentración de glicerina en la muestra. Se evidencia una similitud al comparar los CV obtenidos para el crudo de glicerina y la glicerina purificada en ambos lotes, lo cual indica que la variación no se debe al proceso de purificación, sino a la heterogeneidad de la muestra.

El método volumétrico utilizado para determinar el contenido de glicerina presente en las muestras, se basa en la oxidación de la glicerina en un medio fuertemente ácido para generar formaldehído y ácido fórmico, el cual posteriormente se valora con una base (ver ecuación 2). Debido a que el medio en que se encuentra la reacción es fuertemente ácido requiere de la valoración de un blanco. La cuantificación de la glicerina cruda es necesaria ya que si se desea comercializarla es preciso conocer el porcentaje al que se encuentra.



Validación del método de purificación y cuantificación volumétrica en el crudo de glicerina

Estudio de recuperación

Se enriqueció una muestra de crudo de glicerina en tres ocasiones. Esta prueba se llevó a cabo en parejas, es decir se purificó la muestra enriquecida y sin enriquecer de cada réplica conjuntamente. Por lo tanto, se calculan porcentajes de recuperación para cada réplica. Esto debido a la baja homogeneidad de la muestra de crudo de glicerina. Los resultados se muestran en el Cuadro III.

CUADRO III. Porcentajes de recuperación en la cuantificación de glicerina en las muestras de crudo enriquecidas.

Réplica	Glicerina original (g)	Glicerina enriquecida (g)	Glicerina experimental (g)	Glicerina teórica (g)	% R
1	27,72 ± 0,08	9,98 ± 0,01	37,11 ± 0,08	37,70 ± 0,08	94
2	29,52 ± 0,08	10,01 ± 0,01	39,47 ± 0,08	39,53 ± 0,08	99
3	25,75 ± 0,08	10,03 ± 0,01	36,01 ± 0,08	35,78 ± 0,08	102

A pesar de la heterogeneidad de la muestra, se obtuvieron porcentajes de recuperación bastante aceptables. Esto refleja que el procedimiento seguido es capaz de cuantificar adecuadamente la glicerina en esa matriz, ya que no muestra pérdidas importantes del contenido de glicerina. Estos porcentajes de recuperación y los CV obtenidos al valorar las muestras de crudo de glicerina (Cuadro I y II) confirman que la variación no se debe al proceso de purificación, sino a la alta viscosidad de la muestra que no permite una adecuada homogeneidad, descartando así la presencia de errores sistemáticos. Se recomienda buscar un método alternativo para homogenizar la mezcla de glicerina.

Estudio de la precisión bajo condiciones de repetibilidad

Una muestra de glicerina pura (99,8 %) se valoró repetidamente siguiendo el procedimiento ASTM D7637-10. Este procedimiento reporta una desviación estandar máxima de 0,3, la cual resulta menor a la obtenida en el laboratorio que corresponde a 0,4. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro IV.

Los coeficientes de variación y la desviación estándar se consideran aceptables para la implementación del método bajo estas condiciones de laboratorio

Validación de la metodología de análisis por cromatografía de gases

Para la validación de esta metodología se evaluaron diversos parámetros de desempeño: linealidad y ámbito de trabajo, límites de detección y cuantificación, sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica, precisión y veracidad.

El apéndice A1 muestra un cromatograma para un patrón de la curva de calibración que contiene glicerina, monooleína, dioleína, trioleína y los dos estándares. El cromatograma muestra que los tiempos de retención relativos con que se trabajó corresponden a los consignados en ASTM D6484-08.

CUADRO IV. Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad.

Réplica	Glicerina (%)
1	99,2
2	99,7
3	99,3
4	99,6
5	100,4
6	99,6
7	99,2
Promedio	99,6
Desviación estándar	0,4
% CV	0,4
Valor teórico	99,8

Linealidad y ámbito de trabajo

En la mayoría de los casos el rango de concentraciones de analito en que se trabajó fue el recomendado por el método ASTM D6584-08. Se amplió el ámbito de trabajo para la trioleína, debido a que las muestras de biodiesel presentaban altas concentraciones.

Para el estudio de la linealidad, se utilizó la regresión por mínimos cuadrados no ponderados, ya que tal como se muestra más adelante, se obtiene un comportamiento homocedástico y en estos casos se recomienda una regresión no ponderada, debido a que los errores en la curva de calibración respecto a la variable dependiente (eje de las ordenadas) son aproximadamente iguales para todos los puntos.

Además para el estudio de la linealidad, se realizó el análisis del criterio F_{ANDEVA} y de las gráficas de residuales. Los resultados obtenidos para estos parámetros se resumen en el cuadro V. En todos los casos los ajustes son lineales de acuerdo con el criterio de F_{ANDEVA} , ya que los valores experimentales de F son mayores que el valor crítico. Además al realizar un análisis gráfico de los residuales, se permite concluir que el modelo de regresión lineal utilizado es adecuado, ya que los residuos parecen aleatorios. El método de referencia ASTM sugiere que el coeficiente de correlación lineal debe ser superior a 0,99, valor que se supera en todos los casos.

Cuadro V. Pruebas de linealidad para glicerina en cromatografía de gases.

Prueba estadística	Valor experimental			
	Glicerina	Monooleína	Dioléina	Trioléina
Coefficiente de correlación (R^2)	0,9951	0,9990	0,9985	0,9907
Pendiente	1,133	1,367	1,016	0,465
Intercepto	-0,007	-0,008	-0,035	-0,181
F_{ANDEVA}	203,07 (10,13)	1067,46 (10,13)	664,22 (10,13)	64,39 (5,59)

Entre paréntesis los valores crítico ($\alpha=0,05$).

El conjunto de estos resultados estadísticos permiten concluir que el ámbito de trabajo en que se realizaron las mediciones es lineal y por lo tanto adecuado.

Pruebas de homogeneidad de varianzas

Se realizaron dos pruebas estadísticas de homogeneidad con el programa Minitab 15, la prueba de Levene y la prueba de Bartlett, ambas con un nivel de significancia de 0,05.

En ambas pruebas, la hipótesis nula (H_0) establece que las varianzas de la población en consideración son iguales, y la hipótesis alternativa (H_1) que no todas las varianzas son iguales. Los valores de p obtenidos para ambas pruebas se muestran en el cuadro VI. Si el $p_{\text{experimental}}$ es mayor a 0,05 se acepta la hipótesis nula y se concluye que no existe diferencia entre las varianzas.

CUADRO VI. Pruebas de homogeneidad para las curvas de calibración.

	Valor de P Prueba de Bartlett	Valor de P Prueba de Levene
Glicerina	0,040	0,332
Monooleína	0,026	0,235
Dioléina	0,386	0,490
Trioléina	0,215	0,169

Para el caso de la glicerina y la monooleína las pruebas de Bartlett y Levene muestran resultados contradictorios, por lo tanto fue necesario realizar un estudio de normalidad para los datos, debido a que la prueba de Bartlett es robusta únicamente cuando los datos siguen distribuciones normales, mientras que Levene es robusta si los datos provienen de distribuciones continuas, pero no normales. Para esto, se realizaron dos pruebas de normalidad: Anderson-Darling y Ryan-Joiner, utilizando un $\alpha=0,1$. Si el $p_{\text{experimental}}$ es menor a 0,1 se rechaza la H_0 y se concluye que los datos no siguen una distribución normal. Tal como lo muestran los resultados del cuadro VII, todos los datos muestran una distribución no normal, por lo que se esperaría que Levene tenga mayor importancia que Bartlett.

CUADRO VII. Pruebas de normalidad para las curvas de calibración.

	Valor de P Anderson-Darling	Valor de P Ryan-Joiner
Glicerina	0,025	0,042
Monooleína	0,005	0,020
Dioléina	0,022	0,038
Trioléina	0,051	0,075

De los datos anteriores se concluye que todos los compuestos presentan una distribución homogénea de las varianzas en el intervalo de trabajo, es decir son homocedásticos. Esto indica que la concentración en los patrones no influye en la variabilidad de las mediciones.

Límite de detección y límite de cuantificación

Estos límites se calcularon según lo recomendado por Miller-Miller, utilizando un nivel de confianza al 95 %. Estos límites son calculados como la desviación estándar del blanco dividida entre la pendiente, este factor multiplicado por tres para el de límite de detección y por 10 para el de cuantificación. Los resultados se muestran en el Cuadro VIII.

CUADRO VIII. Límites de detección y cuantificación según Miller-Miller, para los diferentes compuestos por cromatografía de gases.

Compuesto	Límite de detección (mg)	Límite de cuantificación (mg)
Glicerina	0,003	0,012
Monooleína	0,032	0,110
Dioleína	0,016	0,039
Trioleína	0,103	0,331

El parámetro de límite de detección es una estimación aproximada. Aunque es importante para la validación de la metodología, no tiene implicación directa en la forma en que se realiza el análisis, pues las muestras de biodiesel con que se trabajó y los mínimos establecidos por el Reglamento Centroamericano no presentaban concentraciones tan bajas que impliquen trabajar en la cercanía a dicho límite. El límite de cuantificación también es una estimación aproximada, la cual tiene mayor importancia en la metodología, pero de igual manera las muestras de biodiesel no se trabajaron a concentraciones muy bajas. Por lo tanto, los límites se consideran adecuados para el método.

El Cuadro VIII evidencia que los límites de detección y cuantificación son mucho mayores para la trioleína debido a la dificultad para cuantificar este compuesto, por la baja relación señal/ruido. Sin embargo, lo anterior no resultó un problema debido a que las muestras pueden ser cuantificadas adecuadamente.

Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica

La sensibilidad de calibración se determina con la pendiente de las curvas de calibración, es decir, es la relación entre el cambio en la respuesta y el cambio en la cantidad de analito. De esta manera, un valor alto de pendiente indica una alta sensibilidad. Por su parte, la sensibilidad analítica se determinó como la división entre la sensibilidad de calibración y la desviación estandar para tres niveles de concentración diferentes. El Cuadro IX resume estos datos para los diversos compuestos en estudio.

CUADRO IX. Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica para cada analito.

	Masa (mg)	Sensibilidad calibración $A(\text{mg}/\text{mg}_{\text{est}})^{-1}$	Sensibilidad analítica $(\text{mg}_{\text{est}}/\text{mg})$
Glicerina	0,005	1,132	210
	0,035		68
	0,050		76
Monooleína	0,100	1,367	138
	0,250		158
	1,000		41
Dioleína	0,050	1,015	142
	0,150		153
	0,300		94
Trioleína	0,350	0,464	35
	0,750		20
	1,320		22

Tanto la sensibilidad de calibración como la sensibilidad analítica resultan similares para la glicerina, la monooleína y la dioleína, pero es mucho menor para la trioleína. Lo anterior indica que la técnica es menos sensible para este compuesto.

Estudio de precisión bajo condiciones de repetibilidad

El estudio de precisión se llevó a cabo mediante la lectura de los compuestos a tres niveles diferentes de concentración, realizando seis lecturas en cada nivel. Para el caso de la trioleína únicamente se realizaron cuatro mediciones a cada nivel. En el Cuadro X se muestran los resultados del estudio de repetibilidad.

Cuadro VIII. Estudio de repetibilidad para la glicerina a tres niveles diferentes.

Analito		Nivel 1 (mg)	Nivel 2 (mg)	Nivel 3 (mg)
Glicerina	Media	0,006	0,024	0,051
	Desviación estándar	0,001	0,001	0,001
	% CV	8,6	4,6	2,8
Monooleína	Media	0,099	0,516	0,991
	Desviación estándar	0,006	0,010	0,019
	% CV	5,8	1,9	2,0
Dioleína	Media	0,055	0,146	0,303
	Desviación estándar	0,006	0,005	0,008
	% CV	10,2	3,6	2,8
Trioleína	Media	0,045	0,105	0,437
	Desviación estándar	0,011	0,019	0,017
	% CV	23,6	18,1	3,9

Los coeficientes de variación mostrados evidencian una mayor variabilidad para las concentraciones más bajas. Esto se debe a que en esta zona hay mayor variabilidad de la respuesta, debido a que la baja concentración se encuentra cerca de los límites de detección y cuantificación. A diferencia de los valores de desviación estándar mostrados, el coeficiente de variación es un mejor indicador de la variabilidad, debido a que considera la concentración del analito. Es importante mencionar que al ser la técnica menos sensible para la trioleína se presentan mayores coeficientes de variación.

Recuperaciones

Se evaluó la veracidad mediante estudios de recuperación. Para ello una muestra de biodiesel se enriqueció con una cantidad conocida de estándar de glicerina en varias ocasiones. Los porcentajes de recuperación obtenidos se muestran en el cuadro XI.

CUADRO IXI. Resumen de los resultados obtenidos en la prueba de recuperación de glicerina.

Réplica	C_{org} Glicerina	C_{exp} Glicerina	C_{adic} Glicerina	% R
1	0,00029	0,00040	0,00011	100
2	0,00029	0,00041	0,00012	109
3	0,00029	0,00040	0,00011	99

C_{org}: concentración original. C_{exp}: concentración experimental. C_{adic}: concentración adicionada.

Estos porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los valores esperados y considerados aceptables, por lo que las variaciones encontradas en el análisis se podrían explicar por errores aleatorios, ya que el método no involucra pérdidas importantes del analito.

Resultados del contenido de glicerina libre y total en el biodiesel por cromatografía de gases

Se analizó el contenido de glicerina libre y enlazada (monoacilglicérols, diacilglicérols y triacilglicérols) en dos muestras de biodiesel comercial. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro XII. El desglose del contenido de cada acilglicérol y las réplicas se detalla en el anexo III.

CUADRO XI. Contenido de glicerina libre y total en las muestras de biodiesel y el valor máximo reportado en la normativa, lote A y lote B.

	Lote A	Lote B	%
	% Experimental	% Experimental	Normativa
Glicerina Libre	0,030	0,014	0,020
Glicerina Total	0,931	1,831	0,240

Los resultados anteriores indican que la muestra de biodiesel etiquetada como A supera ambos parámetros. Mientras que la muestra etiquetada como B sobrepasa el contenido de glicerina total. Ambos lotes alcanzan valores muy elevados de glicerina total, esto debido a que el contenido de triacilglicérols y diacilglicérols es muy elevado.

La cantidad de glicerina libre y total presente en el biodiesel depende del proceso de purificación utilizado. En la mayoría de los casos, el biodiesel se separa de la glicerina debido a la diferencia de densidades por el método de decantación o centrifugación. Posteriormente, al biodiesel se le realiza una serie de lavados con agua ligeramente ácida. Sin embargo, estos lavados remueven únicamente los compuestos más polares, como glicerina y monoacilglicérols, y no resulta efectivo para remover restos de diacilglicérols y triacilglicérols. Por lo tanto en algunos casos es común encontrar un alto contenido de estos últimos compuestos.

Otro factor determinante en el contenido de glicerina del biodiesel, es la conversión con que se lleva a cabo la reacción de transesterificación. En estos casos se observa que la reacción es incompleta y presenta gran cantidad de reactivo (triacilglicérols) en el producto.

Si el contenido de glicerina libre en el biodiesel es elevado puede generar problemas en el sistema de combustión de los vehículos. Altos niveles de glicerina total pueden ocasionar suciedad de los inyectores y contribuir a la formación de depósitos en las boquillas de inyección, pistones y válvulas.

A la luz de los resultados obtenidos y la experiencia del trabajo con muestras de glicerina cruda se puede decir que los parámetros de desempeño de precisión bajo condiciones de repetibilidad y recuperación son aceptables bajo condiciones normales de laboratorio. Se descartó la etapa de purificación con carbón activado ya que de alguna manera la glicerina queda retenida en el proceso. Se recomienda la búsqueda de un método alternativo para lograr la homogeneidad de la muestra de crudo de glicerina, ya que la alta viscosidad de la muestra evita obtener mejores resultados.

En cuanto a la metodología por cromatografía de gases para la cuantificación de glicerina libre y total en biodiesel, se determinó la linealidad del ámbito de trabajo, el comportamiento homocedástico de los datos, la sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica, repetibilidad y porcentaje de recuperación. Todos estos parámetros de desempeño cumplen con los requerimientos necesarios para la aplicación de esta metodología para la cuantificación tanto de

glicerina libre, como glicerina total. De igual manera, los límites de detección y de cuantificación, son apropiados para esta técnica en este ámbito de trabajo.

Se obtuvo que la muestra de biodiesel identificada como lote A excede los parámetros establecidos para glicerina total y libre, mientras que el lote B presenta un contenido de glicerina libre aceptable, pero excede el contenido de glicerina total. Esto genera preocupación porque este biocombustible se encuentre en uso en el país.

IV. REFERENCIAS

- [1] American Society for Testing Material, US. (ASTM), *Standard specification for biodiesel fuel stock (B100) for middle distillate fuels. D6751-11b*, 2011.
- [2] T. Issariyakul, Biodiesel production from fryer grease, Tesis de maestría en Ingeniería Química, Universidad de Saskatchewan, Saskatchewan, Canadá, 2006.
- [3] F. Esquivel, Análisis técnico y económico de alternativas potenciales para la utilización de la glicerina generada en la producción de biodiesel, Tesis de licenciatura en Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2010.
- [4] R. Larosa, «Biodiesel Uruguay» 2013. [En línea]. Disponible en: <http://www.biodiesel-uruguay.com/articulos/Biod-rev2.pdf>. [Último acceso: 20 30 2013].
- [5] A. Singhabhandhu y T. Tezuka, *Energy*, pp. 2493-2504, 2010.
- [6] J. Bonef, J. Costa, R. Sire, J. Reneaume y J. Bozga, *Food and bioproducts*, pp. 171-178, 2009.
- [7] *Decreto DE-34128. Reglamento técnico centroamericano. Biocombustibles. Biodiesel (B100) y sus mezclas con aceite combustible diesel. Especificaciones.*, San José: La Gaceta, 2007.
- [8] M. Dorado, Desarrollo y ensayo de nuevos biocombustibles para motores diesel procedentes de diversas semillas oleaginosas y de grasas vegetales usadas, Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, 2001.
- [9] American Society for Testing Materials, US. (ASTM), *Determination of glycerin assay by titration (sodium meta periodate). Designación D7637*, 2010: ASTM, 2010.
- [10] American Society for Testing Materials, US (ASTM), *Determination of free and total glycerin in B-100 biodiesel. Methyl esters by gas chromatography. Designación D6584*, ASTM, 2008.
- [11] *Minitab 15, Statistical Software.*, 2012.
- [12] J. Miller y J. Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*, Madrid: Person, 2002.
- [13] International Organization for Standardization, *ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurements, methods and results*, 1994.
- [14] S. Kongjao, S. Damronglerd y M. Hunsom, «Purification of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant,» *Korean J. Chem. Eng.*, pp. 944-949, 2010.
- [15] D. Lizana, «Antecedentes generales sobre biodiesel» 2011. [En línea]. Disponible en: http://www.ecodesarrollo.cl/descargas/Antecedentes_Biodiesel_D.pdf. [Último acceso: 25 03 2013].

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento a la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica por proveer las instalaciones para el desarrollo del presente trabajo. Así mismo, al Sr. Eduardo Valerio por su asesoría y colaboración en el uso de los instrumentos.

APÉNDICE 1

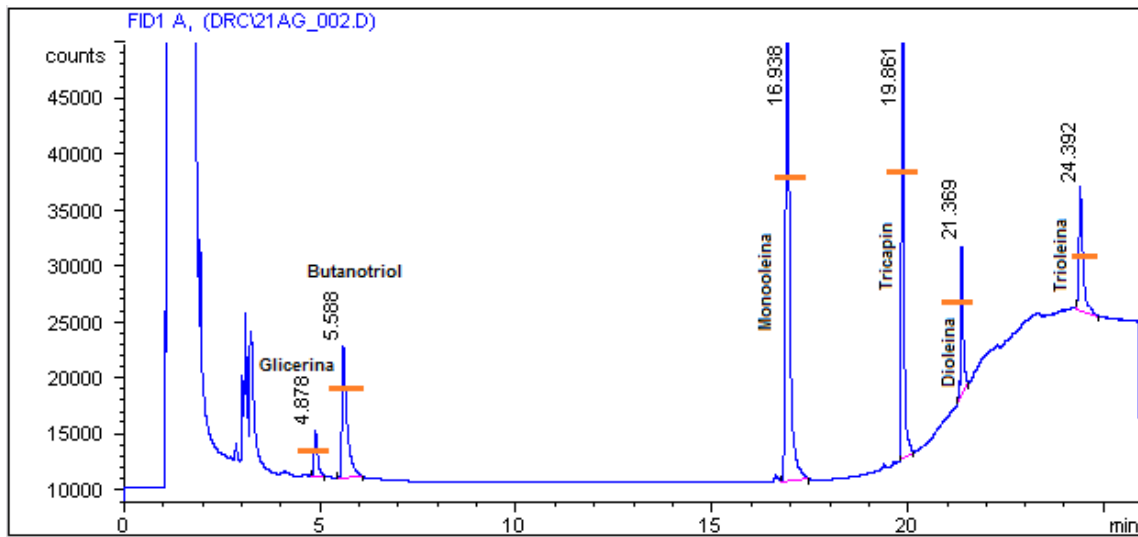


FIGURA 1. Cromatograma del patrón 3 de la curva de calibración.