

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

LICENCIATURA EN QUÍMICA



TESIS

**DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE GLICEROL
EN BIODIESEL MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**

Para obtener el título de
licenciado en química

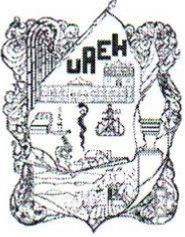
PRESENTA:

Carlos Eduardo Lozano Olvera

DIRECTOR:

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

MINERAL DE LA REFORMA, HGO., MÉXICO, ABRIL 2023



Mineral de la Reforma, Hgo., a 24 de abril de 2023

Número de control: ICBI-D/412/2023
Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Química **Carlos Eduardo Lozano Olvera**, quien presenta el trabajo de titulación "**Diseño de una metodología de análisis de glicerol en biodiesel mediante electroforesis capilar**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Secretario: Dra. María Elena Páez Hernández

Vocal: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Suplente: Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



OAAS/YCC

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx



“Nuestras virtudes y nuestros defectos
son inseparables,
como la fuerza y la materia.
Cuando se separan,
el hombre deja de existir”

- Nikola Tesla

DEDICATORIA

A mi madre: Arcelia Olvera García por su apoyo constante a lo largo de mi preparación, que a pesar de todos los altibajos siempre estuvo para mí, dedicando esfuerzo para hacer de mí un profesionalista. Por el amor dado y toda las enseñanzas directas e indirectas que pasamos juntos... Te amo.

A mi ma: María Luisa García Olvera por todos los consejos que me brindó, por el cariño y apoyo incondicional, por las pláticas hasta altas horas de la noche y por hacer de mí una parte de lo que soy ahora... Te amo.

A mis hermanos: Hector Guillermo y Luis Ángel, que de alguna manera contribuyeron en mi formación como profesionalista... Creo... Por todos los momentos compartidos y por todas las veces que estuvieron para mí.

A los seres que siempre quise y recordaré con mucho amor: Elena Marín, Ma. Guadalupe Romero, Arturo Marín por brindarme todo el apoyo y afecto en momentos complicados de mi vida, por los consejos y lindos momentos juntos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Antonio Rodríguez por aceptar la elaboración de este proyecto conmigo, por todo su tiempo, conocimientos, amistad, mucha paciencia, por estar siempre a disposición de apoyarme y por enseñarme que siempre hay algo de lo que nos podemos asombrar incluso con nuestros errores.

A la Dra. Noemí Andrade por todos los conocimientos que me brindó, el apoyo en momentos difíciles, los consejos, su amistad y por siempre creer en mí.

A la Dra. Rosa Luz Camacho por el aprendizaje adquirido, por los consejos, la amistad, por el apoyo que me ha brindado.

A la Dra. María Elena Páez por sus consejos, por su tiempo para asuntos académicos y personales, por su conocimiento, por los regaños y llamadas de atención, por la confianza, por siempre creer en mí y ayudarme a ser mejor persona.

Este es mi primer trabajo de investigación que me acompañará toda la vida, dedicado a todas las personas que han estado conmigo y las que ya no están pero que dejaron algo en mí, mi familia, amigos y profesores. Muchas gracias.

Índice

Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iii
Resumen	iv
1. Antecedentes	6
1.1. Biodiesel	6
1.2. Síntesis de biodiesel	7
1.3. Parámetros de calidad de biodiesel	8
1.4. Formación de glicerol	10
1.5. Determinación de glicerol en biodiesel	11
1.5.1. Técnicas volumétricas	11
1.5.2. Métodos espectroscópicos	13
1.5.3. Técnicas electroquímicas	15
1.5.4. Técnicas de separación instrumental	16
2. Objetivos	19
2.1. General	19
2.2. Específicos	19
3. Metodología	21
3.1. Reactivos y soluciones	21
3.2. Instrumentación	21
3.3. Electroforesis capilar	21
3.3.1. Electroforesis capilar de zona	21
3.3.2. Cromatografía micelar electrocinética utilizando 2,4-DNPH como agente derivatizante	22
3.3.3. Cromatografía micelar electrocinética utilizando MBTH como agente derivatizante	23
3.4. Validación de la metodología propuesta	23
3.5. Análisis de muestras	26
4. Resultados y discusión	28
4.1. Electroforesis capilar	28
4.1.1. Electroforesis capilar de zona	28
4.1.2. Cromatografía micelar electrocinética utilizando 2,4-DNPH	29
4.1.3. Cromatografía micelar electrocinética utilizando MBTH	32
4.2. Validación de la metodología analítica	34
5. Conclusiones	39
6. Referencias	41

Índice de Figuras

Figura 1. Reacción sucesiva de transesterificación.	8
Figura 2. Electroferograma del análisis de una solución estándar de IO_4^- (200.0 mg L^{-1}), IO_3^- (200.0 mg L^{-1}), NO_3^- (50.0 mg L^{-1}), pH 9, 14 kV y 220 nm. Tiempo de análisis: 18 min.	28
Figura 3. Gráficos de medias para la resolución de señales de HCOH y pentanal con condición óptima: SDS 20.0 mM, Tetraborado de sodio 25.0 mM y pH 9.5	30
Figura 4. Electroferograma; determinación de una solución estándar de 2,4-DNPH (250.0 mg L^{-1}), pentanal (12.5 mg L^{-1}) y formaldehído (10.0 mg L^{-1}). SDS 20.0 mM, Tetraborato de sodio 25.0 mM, pH 9.5, 14 kV a 360 nm.....	31
Figura 5. Electroferograma; determinación de una solución estándar de 2,4-DNPH (250.0 mg L^{-1}), pentanal (12.5 mg L^{-1}) y glicerol (25.0 mg L^{-1}). SDS 20.0 mM, Tetraborato de sodio 25.0 mM, pH 9.5, 14 kV a 360 nm.	32
Figura 6. Electroferograma; determinación de una solución estándar de MBTH (100.0 mg L^{-1}), formaldehído (5.0 mg L^{-1}) y tartrazina (15.0 mg L^{-1}). SDS 20.0 mM, Tetraborato de sodio 25.0 mM, pH 9.5, 14 kV a 230 nm.	33

Índice de Tablas

Tabla 1. Estándares normativos de biodiesel	9
Tabla 2 Parámetros de calidad de biodiesel.	10
Tabla 3. Condiciones analíticas ASTM D6584 / EN 14105.....	16
Tabla 4. Matriz de experimentos de tipo Taguchi (L_93^3).	29
Tabla 5. Evaluación en la composición del electrolito de trabajo	34
Tabla 6. Contenido de glicerol en biodiesel (%m/m, %RSD, n=3) por la metodología propuesta (MEKC) y UV/Vis.....	35
Tabla 7. Comparativa de las metodologías estándares para la determinación de glicerol en biodiesel y la metodología propuesta.	37

Resumen

El biodiesel es un combustible sintetizado a partir de recursos naturales como son: *aceites vegetales, grasas animales y aceite de cocina reciclado*. Los beneficios del uso de biodiesel aumentan el interés científico, debido a los bajos niveles de impacto en el medio ambiente en comparación con el diesel común, así como su potencial para reducir la dependencia cotidiana en combustibles fósiles [1]. El biodiesel puede utilizarse en diferentes sectores, tales como; *Transporte, Sistemas de calentamiento, Sistemas eléctricos, Agricultura y Hogares*. El uso de este biocombustible reduce significativamente la emisión de gases de tipo invernadero y promueve una práctica sustentable y amigable a nivel industrial. Es por esto que, la producción de biodiesel debe mantenerse bajo estándares de calidad que aseguran su funcionamiento.

Durante la producción de biodiesel se generan subproductos como glicerol, el glicerol es considerado un contaminante principal durante la síntesis de biodiesel. Se considera que incluso un porcentaje bajo de glicerol contenido en el combustible puede ocasionar mal funcionamiento en motores. Es por esto que se establecen normativas que garantizan la calidad en el biodiesel, la *Unión Europea (EN)* y la *American Society for Testing and Materials (ASTM)* indican los límites permisibles de contaminantes presentes en este combustible, entre ellos el glicerol [2].

La determinación de glicerol mediante normativas es bastante precisa, sin embargo, debido a las especificaciones de la metodología, los análisis son de costos elevados y el pretratamiento de las muestras es complicado. Debido a esto, el presente trabajo se enfoca en la aplicación de un método robusto y relativamente sencillo como lo es la espectroscopía UV/Vis o electroforesis capilar que permiten mejorar el estudio de estos compuestos

ANTECEDENTES

1. Antecedentes

1.1. Biodiesel

El biodiesel está compuesto de ésteres monoalquílicos de cadena larga de ácidos grasos (C14-C22) obtenidos a partir de un proceso de transesterificación de materias primas como lo son: grasas animales o aceites vegetales. La elaboración de este biocombustible requiere el uso de productos con un alto contenido de triglicéridos, es por esto que el biodiesel puede elaborarse a partir de aceites de soya, canola, coco, girasol, palma, semillas, a partir de cebos animales (vacunos y porcinos), o recientemente la aplicación de aceites de microalgas, frituras y semillas modificadas. Una de las desventajas es que este tipo de materia prima puede presentar contaminantes como agua o restos alimenticios que afectan la calidad del biodiesel [2]. El biodiesel suele ser adicionado en distintas proporciones con diesel de petróleo, obteniéndose mezclas de biocombustible BXX, donde XX corresponde a la cantidad de biodiesel en muestra.

El método de síntesis más empleado en la elaboración de biodiesel es la transesterificación, el objetivo es reducir la viscosidad en el aceite, por lo tanto, durante el proceso se utilizan catalizadores y solventes que aumentan el rendimiento de la reacción asegurando la conversión de los triglicéridos en el correspondiente éster metílico. Dado el alto contenido en triglicéridos requerido en la materia prima, existen subproductos de reacción como: mono-, di- y triglicéridos (asociados a una transesterificación incompleta), además de la formación de otros compuestos como el glicerol [3]. El contenido de glicerol dentro del biodiesel presenta desventajas en el producto debido a su elevado punto de ebullición que afecta el funcionamiento de motores de combustión, generando impurezas que se emiten al ambiente y repercuten negativamente en la salud humana [3].

El biodiesel es un combustible renovable y sustentable que ofrece un amplio rango de beneficios sobre el diesel a base de petróleo convencional. Las propiedades del biodiesel presentan valores cercanos a cero en compuestos

aromáticos y contenido de azufre que se consideran nocivos para la salud, por lo general tiene un alto índice de cetano y un punto de nube parecido a los combustibles de diesel [4]. Algunas de las ventajas principales adicionales son [4]:

- Reduce la emisión de gases de efecto invernadero: El análisis del ciclo de vida completo demuestra que el biodiesel 100% puro (B100) disminuye la emisión de estos gases en un 74%. El CO₂ absorbido durante el crecimiento de plantas o animales antes de la obtención del aceite como materia prima, es emitido durante la quema de este combustible, balanceando la concentración neta de CO₂ en la atmósfera.
- Mejora el funcionamiento de motores: Incluso en concentraciones bajas mejora la lubricidad disminuyendo el desgaste prematuro de las piezas móviles, además aumenta el índice de cetano del combustible.
- Impacto en la salud: El biodiesel disminuye la emisión de gases nocivos para la salud humana, además de reducir drásticamente la emisión de partículas suspendidas en el aire.
- Estabilidad y almacenamiento prolongado: Presenta una alta estabilidad, similar al diesel de petróleo, aunque es más susceptible a la degradación microbiana.

En general el uso de biodiesel puede ofrecer beneficios económicos, medioambientales y sociales, por lo cual se convierte gradualmente en una alternativa cada vez más popular frente al combustible diesel tradicional a base de petróleo.

1.2. Síntesis de biodiesel

El biodiesel es usualmente producido a partir de un proceso de transesterificación el cual involucra el aceite crudo con un alcohol como solvente (comúnmente metanol o etanol) en presencia de un catalizador (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido sulfúrico o lipasa). El proceso convierte los triglicéridos del aceite o grasa en ésteres metílicos (componentes principales del biodiesel) y glicerol como se muestra en la Figura 1.

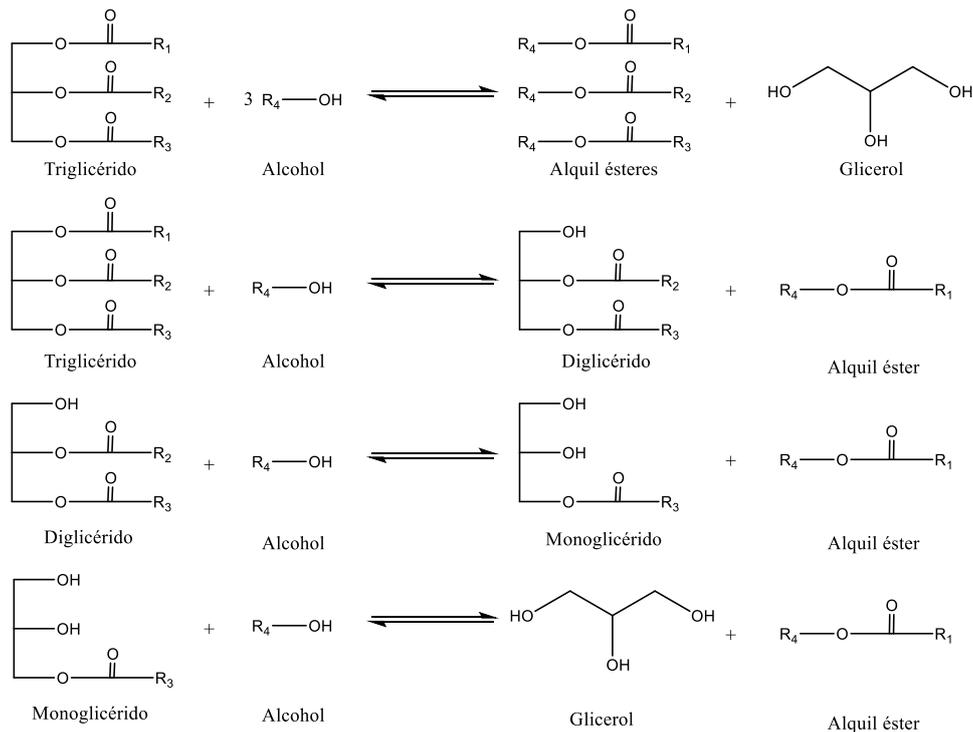


Figura 1. Reacción sucesiva de transesterificación.

La clasificación de la ruta de síntesis se basa en el tipo de catalizador empleado, siendo las principales la catalizada por bases (NaOH o KOH), ácidos (H₂SO₄), enzimática (lipasa) y supercrítica (CO₂) [5]. En todos los casos la formación de subproductos de reacción afecta la calidad del producto final. Debido a la importancia de la calidad del biodiesel, existen diversas normativas que establecen los parámetros que deben ser cumplidos para su uso como combustible.

1.3. Parámetros de calidad de biodiesel

La calidad es un requisito previo para el éxito a largo plazo de un biocombustible. La calidad del biodiesel depende de factores que reflejan sus características químicas y físicas. En la calidad pueden influir diversos factores; la calidad de materia prima, composición de ácidos grasos en el aceite vegetal o grasa animal, el proceso de producción, materiales durante o posterior del proceso, la manipulación y almacenamiento. El interés económico ha promovido que diferentes países adopten estándares de calidad en la producción de biodiesel, tomando en consideración las propiedades principales a cubrir reguladas (índice de cetano, densidad, viscosidad,

contenido de glicerol, entre otros) y no reguladas (composición elemental, capacidad calorífica, composición de los metil ésteres [6].

Los criterios sobre la calidad de biodiesel están en constante cambio y varían dependiendo la región en la que se lleve a cabo la producción. La Tabla 1 presenta una lista de las normas de calidad de biodiesel más importantes en el mundo [6].

Tabla 1. Estándares normativos de biodiesel

País /región	Norma	Título
Unión Europea	EN 14213	<i>Heating fuels- Fatty acid methyl esters (FAME) – Requirements and test methods</i>
Unión Europea	EN 14214	<i>EN 14214 Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – Requirements and test methods</i>
Estados Unidos	ASTM D6751	<i>ASTM D6751 – 11ª Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels.</i>
Australia	---	<i>Fuel Standard (Biodiesel) Determination 2003</i>
Brasil	ANP 42	<i>Brazilian Biodiesel Standard (Agencia Nacional do Petróleo)</i>
India	IS 15607	<i>Bio-diesel (B 100) blend stock for diesel fuel – Specification</i>
Japón	JASO M360	<i>Automotive fuel – Fatty acid methyl ester (FAME) as blend stock</i>
Sudáfrica	SANS 1935	<i>Automotive biodiesel fuel</i>

La Tabla 2 establece los principales parámetros de calidad de biodiesel de acuerdo a las normas EN 14214 y ASTM D6751. Las normas de calidad de biodiesel evalúan el contenido de glicerol total, que se refiere a la suma de mono-, di-, triglicéridos y glicerol libre. El término glicerol libre se refiere al glicerol residual contenido en el biodiesel que no pudo ser separado.

Tabla 2 Parámetros de calidad de biodiesel.

Parámetro	Unidad	EN 14214 (límites permisibles)	Método de ensayo	ASTMD 6751 (límites permisibles)	Método de ensayo
Densidad	kg m ⁻³	860-900	EN ISO 3675 / 12185	—	ASTMD 4052, ASTMD 1298
Viscosidad (40°C)	mm ² s ⁻¹	3.50-5.00	EN ISO 3104	1.9-6.0	ASTMD 445
Punto de inflamación	°C	≥ 101	EN ISO 3679	≥ 93	ASTMD 93
Contenido de azufre	mg kg ⁻¹	≤ 10	EN ISO 20846	≤ 15 / ≤ 500	ASTMD 5453
Número de cetano	—	≥ 51	EN ISO 5165	≥ 47	ASTMD 613
Contenido de agua	mg kg ⁻¹	≤ 500	EN ISO 12937	—	—
Agua y sedimentos	% v/v	—	—	≤ 0.050	ASTMD 2709
Índice de acidez	mgKOH g ⁻¹	≤ 0.5	EN 14104	≤ 0.50	ASTMD 664
Contenido de metanol	% m/m	≤ 0.2	EN 14110	—	—
Glicerol libre	% m/m	≤ 0.02	EN 14105	≤ 0.02	ASTMD 6584
Glicerol total	% m/m	≤ 0.25	EN 14105	≤ 0.24	ASTMD 6584

Alfonso-Alvarez, J., A., Teón-Vega, A., Balderas-López, S., M. 2018 [25].

1.4. Formación de glicerol

El glicerol es un subproducto del proceso de transesterificación utilizado en la producción de biodiesel (Ec. 1). La reacción es secuencial e involucra la ruptura de los enlaces de tipo éster en los triglicéridos y la formación de nuevos enlaces tipo éster con el metanol, produciendo como subproducto durante el proceso al glicerol. Después de la reacción de transesterificación, el glicerol es separado de la mezcla debido a la diferencia de densidades, este puede removerse y purificarse para ser utilizado en otras aplicaciones como producción de jabones o como materia prima para otras reacciones.

Si el glicerol no es completamente removido del biodiesel, puede ocasionar problemas severos como bloqueo en filtros de combustible debido a la formación de emulsiones glicerol / agua dañando el funcionamiento de los

motores. Así mismo, la presencia de glicerol disminuye la estabilidad del biodiesel incrementando la degradación de este a través del tiempo [7].

La determinación de glicerol en biodiesel es esencial durante su producción, puede realizarse mediante diferentes métodos. Las normas ASTM D6584 y EN 14105 establecen procedimientos para la determinación de este:

- La norma ASTM D6584 involucra el uso de cromatografía de gases (GC) para separar los componentes de la muestra, seguido de una detección por ionización de llama (FID) que determina la concentración de glicerol en la muestra [8].
- La norma EN 14104 es similar al método por ASTM D6584, ésta utiliza la cromatografía líquida (LC) como método de separación seguido por una detección de índice de refracción o UV para determinar la concentración de glicerol en la muestra [9].

Ambas metodologías dan como resultados valores precisos en las concentraciones de glicerol en muestras de biodiesel, sin embargo, los costos elevados, dificultad en el pretratamiento de muestra y el elevado punto de ebullición del glicerol además de la ausencia de grupos cromóforos resultan en un desafío para su estudio.

1.5. Determinación de glicerol en biodiesel

Debido a la importancia de la determinación de glicerol en biodiesel existen diversos métodos desarrollados para dicho propósito, de los cuales destacan: las técnicas volumétricas, espectroscópicas, de separación instrumental y electroanalíticas.

1.5.1. Técnicas volumétricas

La titulación ácido-base se ha utilizado en la determinación de glicerol a partir del ácido fórmico obtenido de la oxidación de glicerol con peryodato, La metodología ASTM D7637 valora el ácido fórmico con hidróxido de sodio, utilizando azul de bromotimol como indicador [10]. Sin embargo, la aplicabilidad de la metodología solo es válida para mezclas con alto contenido en glicerol lo que indica limitantes a matrices por analizar. Pisarello et al., propuso la

aplicación de un método volumétrico para la determinación de glicerol libre y glicerol total en muestras de biodiesel. A partir de la reacción de oxidación entre el glicerol y peryodato de sodio generando ácido fórmico y formaldehído.

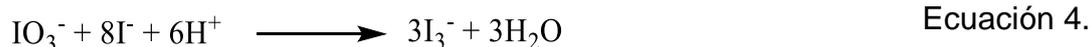
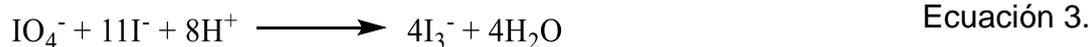


El ácido fórmico es titulado con hidróxido de sodio en una titulación ácido-base simple. Para consumir el exceso de peryodato de sodio se adiciona etilenglicol, siguiendo la reacción:

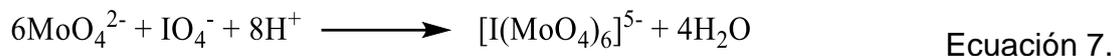


El método presentado propuesto tiene valores de repetitividad y reproducibilidad similares a los presentados por los estándares ASTM o EN (0.005 – 0.05 %m/m de glicerol libre y 0.05 – 0.5 %m/m de glicerol total) que puede ser aplicado a muestras de biodiesel producido a partir de diferentes materias primas [11]. La metodología tiene como ventajas el bajo costo, además de no requerirse de instrumentación como CG, infrarrojo, etc. Sin embargo, las titulaciones del ácido fórmico generado requieren de operaciones adicionales, entre ellas, neutralizaciones sucesivas además de especial atención para evitar la presencia de CO₂ en la solución [11].

Algunas modificaciones son propuestas en las metodologías ABNT NBR 15771 y AOCS Ca 14-56. En ellas se propone cuantificar el glicerol en biodiesel a partir de la reducción del peryodato sobrante y yodato (Ec. 1) a triyoduro (Ec. 3 y 4). El triyoduro es titulado con una solución de tiosulfato de sodio o ácido arsenioso (Ec. 5 y 6) [12]. La limitante del uso está asociada a la elevada concentración de peryodato respecto a la baja concentración de yodato.



Santos L., O. et al., proponen una titulación yodométrica que igualmente involucra la oxidación de glicerol (Ec. 1), adiciona molibdato de sodio como agente complejante con el peryodato, que en medio ácido presenta la siguiente reacción (Ec. 7).



La metodología propuesta involucra las siguientes etapas: (i) oxidación de glicerol con peryodato (Ec. 1), (ii) complejación del exceso de peryodato con molibdato (Ec. 7) y (iii) titulación yodométrica de yodato con tiosulfato (Ec. 5) [12]. El valor obtenido de contenido en glicerol, es similar a los obtenidos mediante metodologías oficiales para dicha determinación con una precisión menor al 8.0% (expresada como porcentaje de desviación estándar relativa %RSD) [12].

Las metodologías volumétricas son relativamente sencillas y de bajo costo, sin embargo, el nivel de precisión y exactitud varía si se encuentran interferentes dentro de la matriz analítica, el tipo de materia prima o el tratamiento de la muestra.

1.5.2. Métodos espectroscópicos

Los métodos espectroscópicos se basan en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por los analitos [13]. Los métodos espectroscópicos son comúnmente utilizados para la determinación del contenido de glicerol en biodiesel.

La resonancia magnética nuclear RMN, es una fuerte herramienta para la caracterización de especies químicas, el uso para la determinación de glicerol en biodiesel es casi completamente de carácter cualitativo. El uso de RMN para la cuantificación de glicerol está muy limitado a la metodología a seguir. Se puede realizar una determinación cuantitativa utilizando ^{13}C RMN en la composición de mezclas de acetilglicerol (mono-, di- y triacetinas) como subproducto de síntesis de biodiesel. La ventaja es el tratamiento de muestra prácticamente inexistente, por lo que, el seguimiento de los desplazamientos químicos para los compuestos acetilados de glicerol es fácil de realizar [14]. El uso de ^1H RMN y ^{13}C RMN brinda una determinación sencilla de glicerol en

muestras de biodiesel, debido a la presencia de señales características para C-H 3.77 ppm, O-H primario 4.54 ppm y O-H secundario 5.12 ppm [15]. La metodología describe valores de precisión menores al 0.60% con límites de detección y cuantificación de 0.015 y 0.045 mM, respectivamente. Dichos parámetros satisfacen los valores normados de glicerol en biodiesel.

De manera similar la espectroscopía por infrarrojo *IR* utiliza las bandas características de las vibraciones de estiramiento y deformación de los enlaces -OH, -CO y -CH presentes en la molécula de glicerol [16]. Sin embargo, es poco conclusivo debido a la complejidad del análisis, elevado costo y baja reproducibilidad del método. Algunos esfuerzos adicionales están asociados al seguimiento de la reacción de transesterificación de aceite vegetal de cocina reciclado. La fracción de glicerol es analizada por FTIR equipado con reflectancia total atenuada empleando como disolvente éter de petróleo. Los espectros muestran bandas características de enlace C-OH obtenidas entre 1460 y 1436 cm^{-1} . La determinación de los metil ésteres de ácidos grasos FAMES se realizó mediante el estudio al espectro infrarrojo de los compuestos, demostrando picos en el intervalo de 1170 y 1200 cm^{-1} correspondientes al enlace de tipo éster O-CH₃. Debido a la facilidad de seguimiento de estos picos, se propone obtener la concentración de cada componente en la muestra de biodiesel, concluyendo su viabilidad cuando se tienen conversiones mayores al 70.0% [17].

Otro método utilizado para la determinación de glicerol en biodiesel es la espectrometría ultravioleta / visible (UV-Vis), la mayoría de las técnicas descritas se basan en la determinación indirecta a través de análisis del formaldehído obtenido de la reacción de oxidación del glicerol con un agente oxidante, siendo el peryodato el más utilizado (Ec. 1) [18]. Respecto al análisis de muestras de biodiesel, se requiere en una primera etapa de una extracción líquido-líquido con hexano:agua, el glicerol se transporta a la fase acuosa y posteriormente se hace reaccionar con peryodato de sodio [18]. Como reactivo derivatizante se han utilizado el 3, 5 diacetil-1,4-hidrolutidina, obteniendo un compuesto cromóforo que presenta una absorbancia máxima a 410 nm con valores de precisión menores al 5.0% [19]. La espectroscopía UV-Vis es un

método simple para determinación de glicerol en biodiesel, requiere un pretratamiento mínimo de la muestra

1.5.3. Técnicas electroquímicas

Los métodos electroanalíticos se han usado para la determinación de glicerol en biodiesel, uno de los más comunes es la amperometría, la cual se basa en la medición de corriente producida por la oxidación de glicerol sobre un electrodo de trabajo. Los biosensores son una de las alternativas evaluadas, se ha descrito el uso de biosensores multienzimáticos de gliceroquinasa y glicerol-3-fosfato oxidasa que modifican un electrodo de oxígeno. El método propuesto demostró tiempos de respuesta cortos (alrededor de 6 minutos), sensibilidad aplicable a la determinación de glicerol en muestras de biodiesel y errores relativamente bajos en los valores de exactitud comparados con metodologías oficiales [20].

Recientemente se propusieron dos metodologías electroanalíticas para la cuantificación de glicerol de acuerdo a la naturaleza de la muestra, siendo estas: i) aplicación de electrodos policristalinos de oro y ii) creación de un biosensor de carbón vítreo-glicerol deshidrogenasa [21].

- I. Electrodos policristalinos de oro; los experimentos amperométricos se realizaron con una corriente de 0.1 V (vs. Ag/AgCl).
- II. Biosensor de carbón vítreo-glicerol deshidrogenasa; preparado en un mortero de ágata mezclando 68.0% m/m de polvo de grafito, 30.0% m/m aceite mineral y 2.0% m/m de glicerol deshidrogenasa. Acondicionado por una capa de poli(*o*-fenilendiamina).

La evaluación de la naturaleza de la muestra se hizo utilizando dos diferentes matrices; una simple (solución acuosa) y otra compleja (caldo Middlebrook 7H9). Ambos electrodos fueron empleados en muestras de biodiesel, el electrodo policristalino de oro fue adecuado debido a que la matriz analítica no fue compleja, mientras que el biosensor amperométrico puede ser empleado, pero incrementa el costo del análisis.

Los métodos electroanalíticos presentan una alta sensibilidad y selectividad, además pueden proporcionar resultados rápidos con una cantidad mínima de muestra. Sin embargo, el método puede verse afectado por la presencia de interferentes con propiedades oxido-reductoras y pueden llegar a requerir

calibraciones cuidadosas y optimizaciones muy específicas para lograr resultados exactos y precisos.

1.5.4. Técnicas de separación instrumental

Los métodos de separación fundamentalmente involucran la separación de componentes en una mezcla para su análisis individual. Las técnicas de separación más utilizadas en la determinación de glicerol en biodiesel incluyen; la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los métodos estandarizados ASTM D6584 y EN 14105 utilizan cromatografía de gases. El procedimiento de tratamiento de muestra, involucra la adición de 1,2,4-butanotriol y 1,2,3-tricaproilglicerol (como estándares internos), seguido de la adición del agente derivatizante N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida [22]. Las diferencias entre ambas metodologías son el tipo de columna (composición, dimensiones, diámetro interno D.I.) y la modalidad de inyección empleadas según se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones analíticas ASTM D6584 / EN 14105

Especificación	ASTM D6584	EN14105
Columna	5% Fenilpolidimetilsiloxano, 10.00 mm o 15.0 mm x 0.32 mm D.I., Temperatura Máx. > 400 °C	100% Dimetilpolisiloxano o 95% dimetil – 5% difenilpolisiloxano. 10.0 mm x 0.32 mm D.I., Temperatura Máx. > 400°C
Precolumna	2.00 - 5.00 m x 0.53 mm D.I.	---
Inyector	Inyección fría en columna	Inyector en columna
Tamaño de muestra	1 µL	1 µL
Temperatura de columna	50 °C (1 min) - 15 °C/min-180 °C - 7 °C/min – 230 °C – 30 °C/min – 380 °C (10 min)	50 °C (1 min) - 15 °C/min-180 °C - 7 °C/min – 230 °C – 10 °C/min – 370 °C (5 min)
Detector	FID, 380 °C	FID, 380°C
Gas portador	H ₂ o He, 3.0 mL/min a 50 °C	H ₂ o He, 80.00 kPa

Ambas metodologías se ven limitadas en cuanto al tipo de muestra, las normas ASTM D6751 y EN 14214 informan el uso de estas metodologías sobre biodiesel elaborado a partir de aceite de canola, soja, coco y semillas de girasol [22].

La técnica por HPLC surge como una alternativa a la GC, se ha descrito la determinación de glicerol a partir de una cromatografía líquida de alta resolución utilizando un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). El glicerol es derivatizado a tribenzoato de glicerilo y separado empleando dos columnas

en serie, la primera columna, C18 (50.0 mm x 3.0 mm D.I., 2.7 μ m) seguido de una columna C8 (50.0 mm x 4.6 mm D.I., 1.8 μ m) [23]. Como fase móvil se usa un sistema de gradiente de agua:acetonitrilo. Los valores de exactitud (porcentaje de recuperación %R) y precisión (%RSD) fueron $\geq 94\%$ y $\leq 0.4\%$, respectivamente [23].

Cozendey, A. et al., aplica la técnica de SPE-HPLC para el diseño de una metodología capaz de separar y cuantificar glicerol libre en biodiesel. Inicialmente se realiza una separación de la fracción hidrofóbica empleando un cartucho con aminopropil como fase sólida y hexano como eluyente. El glicerol queda retenido en la fase móvil y se eluye con H₂SO₄ diluido. La separación se realiza empleando una columna de copolímero de estireno-divinilbenceno funcionalizada con grupos sulfónicos, un detector de índice de refracción y H₂SO₄ (5.0 mM) como fase móvil. [24].

La electroforesis capilar es una técnica de separación y cuantificación que separa a las moléculas cargadas de acuerdo a su masa y carga. De manera inicial podría decirse que no resulta adecuado para la determinación de glicerol libre en biodiesel. Los análisis de glicerol mediante esta técnica se han descrito sobre matrices diferentes al biodiesel. A partir de técnicas por cromatografía micelar electrocinética en muestras de alimentos de origen animal marinos utilizando como agente derivatizante a la 2,4-dinitrofenilhidrazina, polaridad normal y una longitud de onda de detección de 360 nm, demostrando resultados positivos de análisis para dichas muestras [29]. Sin embargo, se ha descrito una metodología que realiza inicialmente una extracción líquido-líquido con agua para separar el glicerol. Posteriormente, la fase acuosa que contiene al analito se mezcla con peryodato para oxidar al glicerol extraído (Ec. 1) y se adiciona nitrato de sodio como estándar interno. La mezcla se analiza mediante electroforesis capilar de zona para cuantificar el yodato formado [18]. El presente trabajo busca diseñar una técnica electroforética que permita disminuir el consumo de reactivos, requiera un tratamiento de muestra mínimo y permita cuantificar glicerol en biodiesel en las concentraciones normadas.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. General

Diseñar una metodología de análisis de glicerol mediante electroforesis capilar para su aplicación en muestras de biodiesel.

2.2. Específicos

- Evaluar estrategias para la determinación de glicerol mediante electroforesis capilar.
- Validar la metodología de análisis propuesta en muestras de biodiesel empleando el protocolo normado por la IUPAC.

METODOLOGÍA

3. Metodología

3.1. Reactivos y soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada purificada mediante un sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Se prepararon soluciones estándar disolviendo el reactivo analítico (todos Sigma-Aldrich): peryodato de sodio ($2,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), yodato de sodio ($2,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), formaldehído ($1,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), glicerol ($1,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato de sodio (500.0 mg L^{-1}), 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) disuelta en acetonitrilo con 5% v/v de ácido acético concentrado (500.0 mg L^{-1}), pentanal ($1,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) ($2,000.0 \text{ mg L}^{-1}$) y tartrazina ($1,000.0 \text{ mg L}^{-1}$).

3.2. Instrumentación

Todos los experimentos de electroforesis capilar se realizaron en un equipo Beckman Coulter PA 800 plus con un detector de arreglo de diodos. Los datos fueron recolectados y analizados en un software Beckman PA sistema 10.1 versión 32 karat. La separación se realizó en un capilar de sílice fundida ($21.5 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m D. I., Agilent}$). Las separaciones se realizaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Al inicio de cada día el capilar fue acondicionado con NaOH 1.0 M por 10 minutos, NaOH 0.1 M por 10 minutos, agua desionizada por 10 minutos y electrolito de trabajo por 10 minutos.

3.3. Electroforesis capilar

A partir de la Ecuación 1, se propusieron tres metodologías de análisis indirecto.

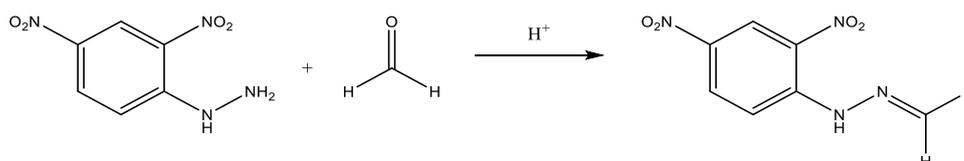
3.3.1. Electroforesis capilar de zona

En un primer acercamiento se consideró la formación de los aniones IO_3^- y la presencia del exceso de IO_4^- , los cuales se propuso separar mediante CZE [18]. En un matraz volumétrico de 10.0 mL se agregaron: 1.0 mL de NaIO_4 ($2,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), 1.0 mL NaIO_3 ($2,000.0 \text{ mg L}^{-1}$), 1.0 mL NaNO_3 (500.0 mg L^{-1}) como estándar interno, aforando con agua desionizada. Se evaluó la

separación de los componentes evaluando electrolitos de trabajo en el intervalo de pH; 2.0, 4.0, 7.0 y 9.0 (20.0 mM) preparadas a partir de glicina, ácido acético / acetato de sodio, fosfato de sodio dibásico / fosfato de sodio y tetraborato de sodio respectivamente. Se evaluó la separación aplicando voltajes de 14 y 20 kV en polaridad normal y una longitud de onda de detección de 230 nm.

3.3.2. Cromatografía micelar electrocinética utilizando 2,4-DNPH como agente derivatizante

En un segundo acercamiento se propuso la determinación de glicerol en biodiesel indirectamente mediante la derivatización del formaldehído formado con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) como agente derivatizante (Ec. 8), el estándar interno evaluado fue pentanal (12.5 mg L⁻¹).



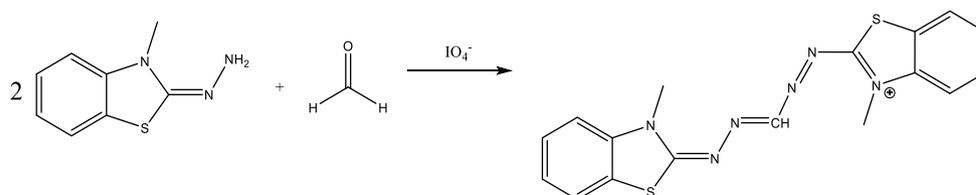
Ecuación 8.

De acuerdo a la Ecuación 8 la imina formada no presenta carga en su estructura, por lo que se propuso realizar la separación mediante cromatografía micelar electrocinética. Se hicieron soluciones estándar de formaldehído en el intervalo de 5.0 – 25.0 mg L⁻¹, agregando 5.0 mL de 2,4-DNPH (500 mg L⁻¹), añadiendo 125 µL de la solución estándar de pentanal (1,000.0 mg L⁻¹) y se aforó a 10.0 mL.

La respuesta esperada dentro de la separación analítica fue aquella composición electrolítica que permitiera un valor de resolución mayor entre los analitos, es por esto que, la composición del electrolito de trabajo fue obtenida empleando un diseño de parámetros de Taguchi (L₉3)³, evaluando las concentraciones de dodecilsulfato de sodio y tetraborato de sodio en intervalos de concentración de 20.0 – 60.0 mM y 15.0 – 25.0 mM respectivamente. Las muestras se analizaron empleando un voltaje de separación de 14 kV en polaridad normal, longitud de onda de detección de 360 nm e inyección hidrodinámica.

3.3.3. Cromatografía micelar electrocinética utilizando MBTH como agente derivatizante

Una tercera evaluación consistió en la determinación indirecta de glicerol mediante la determinación del formaldehído formado usando la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como agente derivatizante. La reacción requiere de la presencia de un oxidante para formar un compuesto cromóforo con un máximo de absorbancia en 630 nm (Ec. 9). El tiempo para que la reacción sea completa es de mínimo 15 minutos, así mismo, se observó que la estabilidad del compuesto bajo condiciones de reacción es de 72 horas, a partir de este margen el compuesto cromóforo comienza a degradarse por lo que la coloración en la solución se modifica. Debido a que se adiciona IO_4^- este ayuda a que la reacción proceda hacia la formación del compuesto derivatizado.



Ecuación 9.

Se realizaron soluciones estándar de glicerol para la obtención de formaldehído en el intervalo de 5.0 – 25.0 mg L⁻¹ añadiendo 300 µL de NaIO₄ (2,000.0 mg L⁻¹), 1.0 mL de MBTH (1,000.0 mg L⁻¹) y 150 µL de tartrazina (1,000.0 mg L⁻¹). La mezcla se aforó a 10.0 mL y se dejó reaccionar por 30 minutos. Posteriormente se analizó la mezcla utilizando como electrolito de trabajo una mezcla de tetraborato de sodio (25.0 mM), dodecilsulfato de sodio (20.0 mM) ajustada a pH de 9.5, un voltaje de separación de 14 kV, una longitud de onda de detección de 230 nm, realizando la separación en polaridad normal.

3.4. Validación de la metodología propuesta

La evaluación de los parámetros analíticos es un paso esencial en el desarrollo de cualquier método analítico. Estos parámetros fueron determinados

mediante el método de mínimos cuadrados, siguiendo la ecuación de la recta (Ec. 10).

$$Resp = b_1[Glicerol] + b_0 \quad \text{Ecuación 10.}$$

Siendo Resp, la señal analítica, b_1 la sensibilidad analítica, [Glicerol] la concentración del analito (mg L^{-1}) y b_0 la ordenada al origen o fondo.

La sensibilidad analítica fue obtenida mediante la Ecuación 11 [26].

$$b_1 = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 11.}$$

Donde: x_i el valor de la concentración del analito, \bar{x} el promedio de las concentraciones, y_i la señal asociada al analito y \bar{y} el promedio de las señales.

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron determinados mediante el protocolo de la IUPAC (Ec. 12 y 13) [27].

$$LOD = \left(\frac{3.29S_e}{b_1}\right) \quad \text{Ecuación 12.}$$

$$LOQ = \left(\frac{10S_e}{b_1}\right) \quad \text{Ecuación 13.}$$

Donde S_e es la desviación estándar y b_1 es la sensibilidad analítica, ambas asociadas a la curva de calibración.

La determinación de S_e (Ec. 12 y 13) se determina mediante la siguiente expresión (Ec. 14) [26]:

$$S_e = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 14.}$$

Siendo y_i la señal experimental y \hat{y}_i la señal ajustada empleando la ecuación de la curva de calibración.

Para la evaluación de la precisión se hicieron tres estándares de glicerol de concentraciones 8.0 mg L^{-1} , 16.0 mg L^{-1} y 24.0 mg L^{-1} medidos por triplicado el mismo día (repetitividad) y durante tres días diferentes (reproducibilidad). La

precisión se expresa como el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de la concentración determinada (Ec. 15).

$$\%RSD = \frac{100 s}{\bar{x}} \quad \text{Ecuación 15.}$$

Donde \bar{x} es el valor promedio de las concentraciones determinadas y s la desviación estándar de los valores

La determinación de la exactitud se evaluó mediante la comparación de los resultados obtenidos del análisis de las muestras (por triplicado) con la metodología propuesta y los obtenidos empleando UV-Vis como método de referencia aplicando una prueba T de dos muestras [28].

Se realizó una prueba F para varianzas de dos muestras siguiendo la Ecuación 16.

$$F_{exp} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Ecuación 16.}$$

Siendo s_1 y s_2 las desviaciones estándar en las mediciones de las metodologías.

De acuerdo al valor de F_{exp} el valor de t_{exp} fue calculado según fuera el caso de acuerdo a las siguientes consideraciones [33]:

- Prueba t para dos muestras con varianzas iguales.

Las Ecuaciones 17 y 18 muestran el cálculo realizado para determinar el valor experimental de t para muestras con varianzas iguales.

$$S_{exp}^2 = \frac{[(n_1-1)s_1^2] + [(n_2-1)s_2^2]}{(n_1+n_2-2)} \quad \text{Ecuación 17.}$$

$$t_{exp} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 18.}$$

Siendo S_{exp} la desviación estándar calculada, n_1 y n_2 el número de mediciones.

Los grados de libertad evaluados se calculan a partir de la Ecuación 19.

$$g. l. = n_1 + n_2 - 2 \quad \text{Ecuación 19.}$$

- Prueba t para dos muestras con varianzas desiguales.

El valor experimental de t para muestras con varianzas desiguales se calcula a partir de la Ecuación 20.

$$t_{exp} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 20.}$$

Los grados de libertad se calcularon a partir de la Ecuación 21.

$$g.l. = \left[\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2}} \right] - 2 \quad \text{Ecuación 21.}$$

Siendo s_1 y s_2 las desviaciones estándar y n_1 y n_2 el número de mediciones realizadas.

3.5. Análisis de muestras

Las muestras de biodiesel fueron obtenidas de aceite vegetal de canola y sintetizadas por el Dr. Jesús Andrés Tavizón Pozos. 250 μL de biodiesel se pesaron en un tubo de centrifuga de 15.0 mL, se adicionaron 800 μL de agua desionizada y 200 μL de diclorometano. La mezcla se centrifugó por 5 minutos a 2,000 rpm, se separa la fase acuosa y se mide una alícuota de 300 μL que se adiciona en un matraz volumétrico de 10.0 mL que contenían previamente 300 μL de NaIO_4 (2,000.0 mg L^{-1}), 1.0 mL de MBTH (1,000.0 mg L^{-1}), y 150 μL de tartrazina (1,000.0 mg L^{-1}). La reacción se dejó durante 30 minutos y las muestras se analizaron por triplicado utilizando un voltaje de separación de 14 kV y una longitud de onda de detección de 230 nm.

Se compararon los resultados obtenidos con un método de referencia basado en espectroscopía UV/Vis. Se pesaron 250 μL de muestra de biodiesel en un tubo de centrifuga de 15.0 mL, se agregaron 800 μL de agua desionizada y 200 μL de diclorometano. Se llevó a centrifugación durante 5 minutos a 2,000 rpm. Se extrajeron alícuotas de 300 μL de fase acuosa y a estas se le agregaron 300 μL de NaIO_4 (2,000.0 mg L^{-1}) y 1.0 mL de MBTH (1,000.0 mg L^{-1}). La reacción se dejó durante 30 minutos y se analizaron por triplicado a una longitud de onda de 630 nm [28].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

4.1. Electroforesis capilar

4.1.1. Electroforesis capilar de zona

Según el estudio realizado por Spudeit, A. et al., se pueden separar y analizar iones inorgánicos, lo que permite proponer una determinación indirecta de glicerol mediante el análisis de IO_4^- , IO_3^- y NO_3^- , el último empleado como estándar interno. La propuesta utiliza un capilar de sílice fundida (32.0 cm x 50 μm I.D.), un voltaje de separación de 30 kV en polaridad normal y pH de 2.3 usando un electrolito de trabajo que consistía en una solución de glicina (20.0 mM) y ácido trifluoroacético TFA (15.0 mM). La detección se llevó a cabo por un detector UV a una longitud de onda de 210 nm e inyección hidrodinámica. Obteniendo resultados en tiempos de migración menores de 30 segundos [18]. Se realizó una prueba preliminar de la separación de los aniones IO_4^- , IO_3^- y NO_3^- mediante la metodología propuesta a una longitud de onda de detección de 220 nm, sin embargo, no se pudo llevar a cabo la determinación de estos aniones por electroforesis capilar de zona bajo las condiciones evaluadas. La Figura 2 muestra la ausencia de señales asociadas a la separación de los analitos de interés. Lo anterior puede atribuirse a tres factores: i) los iones presentan baja absorptividad lo que da como resultado señales confundibles con el ruido instrumental, ii) la baja o elevada movilidad de iones que se oponen al flujo, lo que promueve tiempos de migración elevados y iii) el pH de trabajo ácido que promueve la desactivación del capilar.

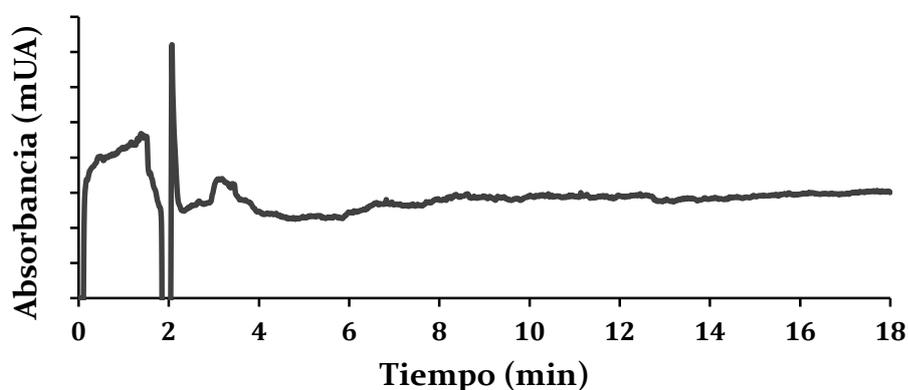


Figura 2. Electroferograma del análisis de una solución estándar de IO_4^- (200.0 mg L⁻¹), IO_3^- (200.0 mg L⁻¹), NO_3^- (50.0 mg L⁻¹), pH 9, 14 kV y 220 nm. Tiempo de análisis: 18 min.

Con la finalidad de mejorar las condiciones de separación, se evaluaron diferentes valores de pH (2.0, 4.0, 7.0 y 9.0) y voltajes de separación (14 y 20 kV). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios al no obtener una separación de los analitos de interés, lo que llevó a descartar la metodología propuesta.

4.1.2. Cromatografía micelar electrocinética utilizando 2,4-DNPH

Se ha descrito el análisis de formaldehído en calamares, langostinos y camarones empleando cromatografía micelar electrocinética y usando 2,4-dinitrofenilhidrazina como agente derivatizante. La separación requiere del uso de electrolitos de trabajo compuestos de tetraborato de sodio y dodecilsulfato de sodio. La detección de los compuestos derivatizados se realizó mediante un detector UV a una longitud de onda de 360 nm [29].

Considerando que el formaldehído permite la detección indirecta de glicerol, se planeó evaluar su aplicación en el análisis de biodiesel. La composición del electrolito de trabajo resulta crítica en separaciones mediante cromatografía micelar electrocinética, por lo que se utilizó un diseño de experimentos de Taguchi (L_93)³ de acuerdo a los parámetros mostrados en la Tabla 4. Se realizó la derivatización del formaldehído utilizando 2,4-DNPH (250.0 mg L⁻¹) preparando soluciones estándares de formaldehído y pentanal (12.5 mg L⁻¹), las cuales fueron separadas con éxito mediante la metodología propuesta.

Tabla 4. Matriz de experimentos de tipo Taguchi (L_93)³.

Experimento	SDS (mM)	Na ₂ B ₄ O ₇ (mM)	pH	Resolución
1	20.0	15.0	8.5	1.9
2	20.0	20.0	9.0	3.4
3	20.0	25.0	9.5	8.9
4	40.0	15.0	9.0	0.9
5	40.0	20.0	9.5	0.7
6	40.0	25.0	8.5	1.3
7	60.0	15.0	9.5	1.4
8	60.0	20.0	8.5	0.8
9	60.0	25.0	9.0	1.2

La matriz experimental fue evaluada y a partir de los resultados obtenidos se construyó un gráfico de medias de efectos principales para la medición de la resolución entre las señales de formaldehído y pentanal. Se observó que la composición óptima del electrolito de trabajo, que permite una separación eficiente de los analitos y una alta resolución entre los picos se alcanzó con una concentración de SDS de 20.0 mM, tetraborato de sodio de 25.0 mM y un pH de 9.5, como se muestra en la Figura 3.

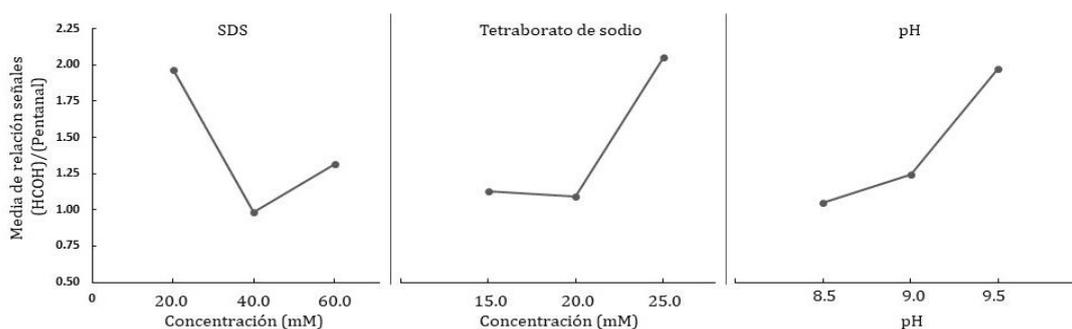


Figura 3. Gráficos de medias para la resolución de señales de HCOH y pentanal con condición óptima: SDS 20.0 mM, Tetraborado de sodio 25.0 mM y pH 9.5

La condición óptima en el electrolito de trabajo permite la separación en muestras estándar de 2,4-DNPH, formaldehído y pentanal (Figura 4). El orden de migración de los analitos se atribuye a la polaridad de estos, los analitos polares tienen mayor afinidad por permanecer en la fase acuosa del electrolito de trabajo, mientras que los no polares prefieren la fase interna de las micelas, compuestas de cadenas de hidrocarburos [32]. Así, las especies más polares migran rápidamente, mientras que las especies menos polares migran más lento debido a su interacción con la fase no polar modificando su movilidad electroforética. El orden de migración es congruente con los obtenidos por Xu, L. et al., durante el análisis de formaldehído en productos comerciales de camarón, calamar y langostino [29].

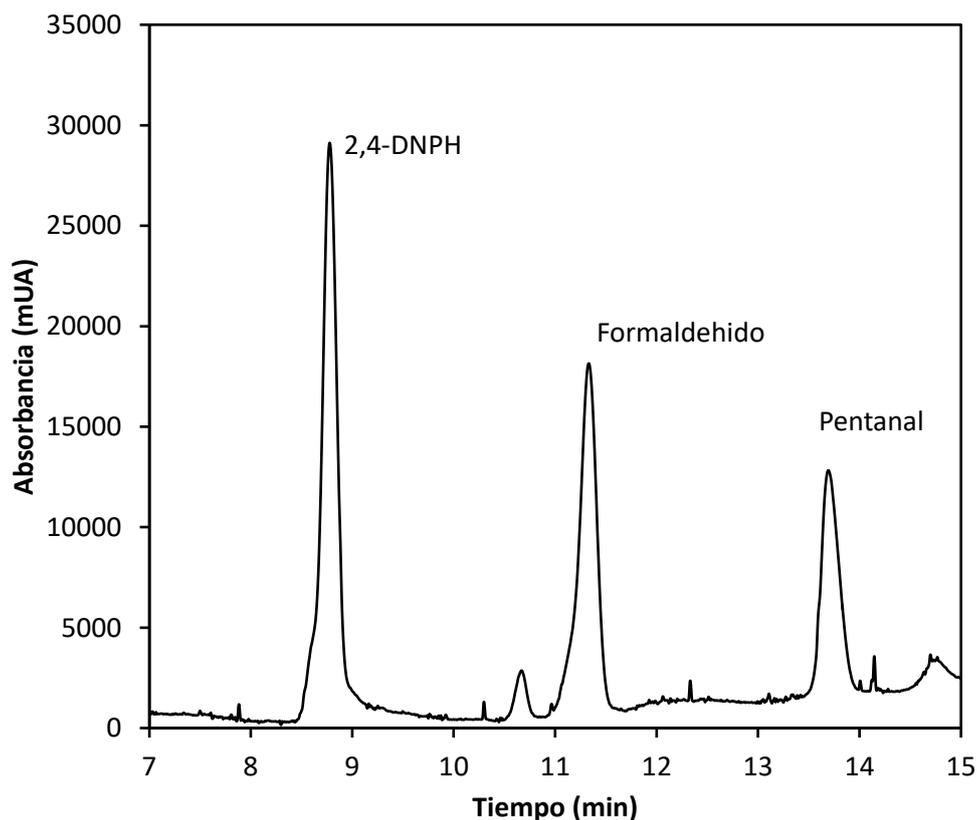


Figura 4. Electroferograma; determinación de una solución estándar de 2,4-DNPH (250.0 mg L⁻¹), pentanal (12.5 mg L⁻¹) y formaldehído (10.0 mg L⁻¹). SDS 20.0 mM, Tetraborato de sodio 25.0 mM, pH 9.5, 14 kV a 360 nm.

La metodología fue aplicada a muestras estándar de glicerol con la finalidad de emular las condiciones de reacción en muestras de biodiesel, sin embargo, bajo las condiciones de trabajo no observa la separación de los analitos de interés (Figura 5). La presencia de agentes oxidantes como IO_3^- y IO_4^- durante la reacción de oxidación del glicerol (Ec. 1) promueve la degradación del 2,4-DNPH y con ello la formación de subproductos durante la reacción de derivatización, afectando el perfil electroforético en el análisis de muestras reales. Algunos de los productos descritos incluyen óxidos de nitrógeno (NO_x) que pueden representar un riesgo para la salud [30].

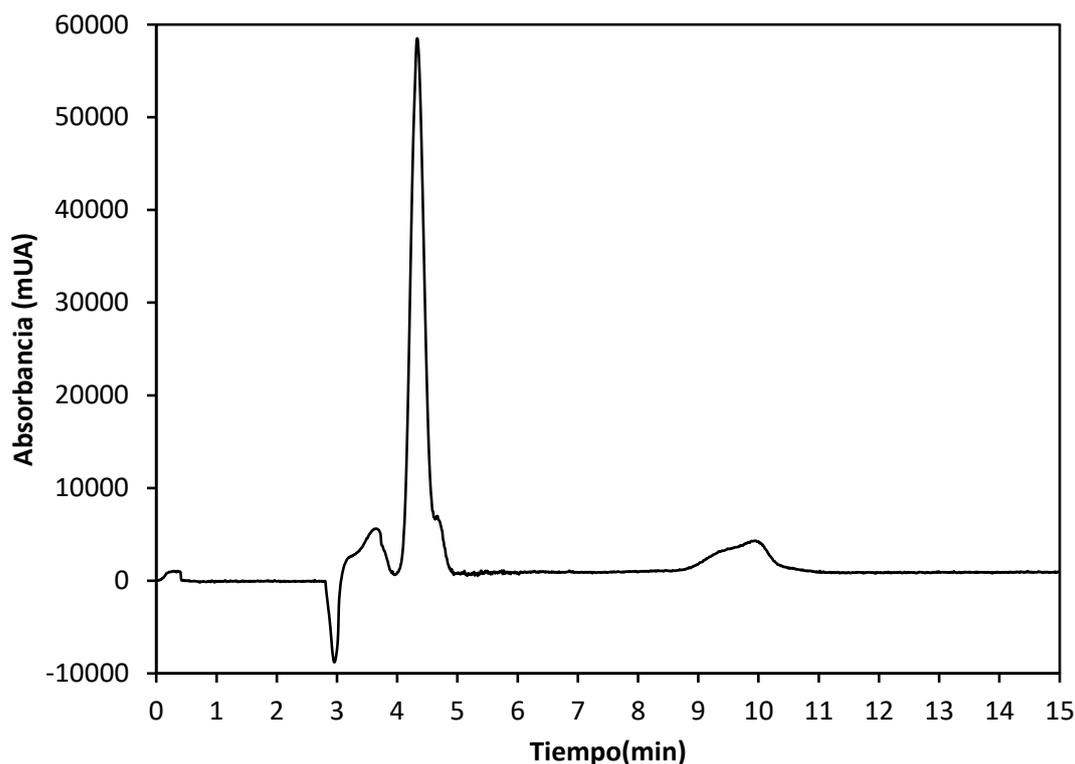


Figura 5. Electroferograma; determinación de una solución estándar de 2,4-DNPH (250.0 mg L⁻¹), pentanal (12.5 mg L⁻¹) y glicerol (25.0 mg L⁻¹). SDS 20.0 mM, Tetraborato de sodio 25.0 mM, pH 9.5, 14 kV a 360 nm.

4.1.3. Cromatografía micelar electrocinética utilizando MBTH

La metodología propuesta por Durand, G. et al., describe la determinación de formaldehído liberado durante la oxidación con peryodato de una sialoglicoproteína a partir de una reacción de derivatización con la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) mediante espectroscopía UV/Vis. La reacción de derivatización requiere la presencia de un agente oxidante para llevarse a cabo, en este caso el anión IO_4^- en exceso promueve la reacción de derivatización [28]. El producto derivatizado es estable y por ello se tienen condiciones adecuadas para su posible integración a cromatografía micelar electrocinética.

Considerando que propuesta se basa en la reacción de una amina con un carbonilo, se propuso evaluar el electrolito de trabajo optimizado en la sección anterior: SDS 20.0 mM, tetraborato de sodio 25.0 mM y pH 9.5, aplicando un potencial de separación de 14 kV. Como muestra se inyectó una mezcla de glicerol/ IO_4^- , seguido de la reacción con MBTH y adicionando tartrazina como estándar interno. Un primer ensayo se realizó para evaluar la separación de

las especies a partir de las condiciones establecidas, utilizando concentraciones de glicerol de 5.0 y 25.0 mg L⁻¹. La Figura 6.A y 6.B. muestra los electroferogramas obtenidos. El orden de migración se atribuye a la polaridad de los analitos, el derivatizante libre (MBTH, $t_{\text{migración}} = 7.84$ min) tiene mayor polaridad que el formaldehído (obtenido de la primera reacción) derivatizado (Glicerol, $t_{\text{migración}} = 9.91$ min), por lo que su tiempo de migración es mejor. Adicionalmente se corrobora que al incrementar la concentración de glicerol se observa una disminución en la señal de MBTH y un incremento en la señal de glicerol.

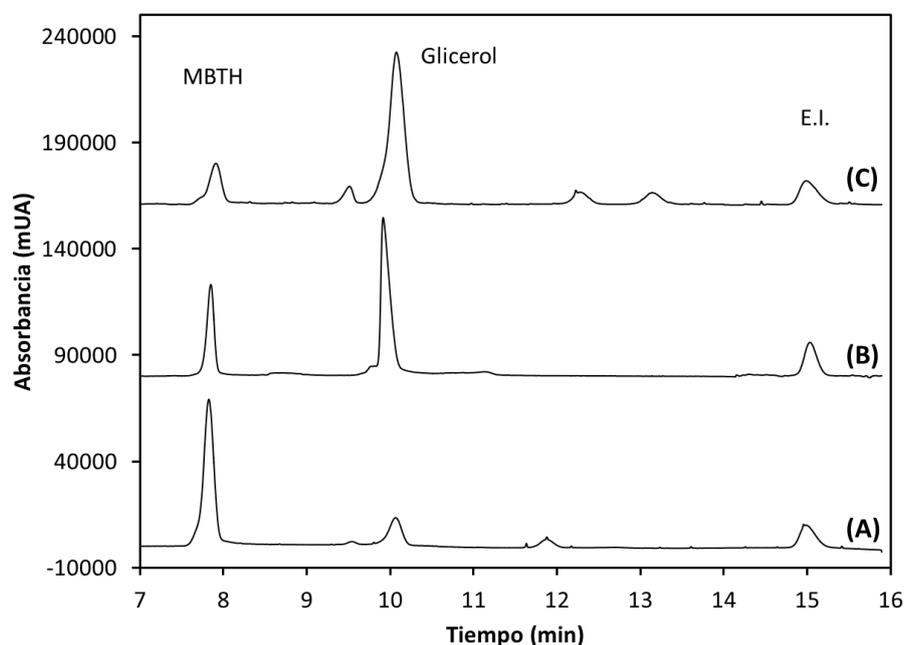


Figura 6. Electroferograma; determinación de una solución estándar de MBTH (100.0 mg L⁻¹), formaldehído (5.0 mg L⁻¹) y tartrazina (15.0 mg L⁻¹). SDS 20.0 mM, Tetraborato de sodio 25.0 mM, pH 9.5, 14 kV a 230 nm. A) Concentración de glicerol 5.0 mg L⁻¹. B) Concentración de glicerol 25.0 mg L⁻¹

Con la finalidad de evaluar la aplicación al análisis de muestras de biodiesel derivado de aceite vegetal de canola, se evaluaron las condiciones de reacción-derivatización-separación obteniéndose el electroferograma presentado en Figura 6.C. Al requerir la reacción un agente oxidante, (IO_4^- y IO_3^-) se observa que la metodología propuesta permite el análisis de glicerol en las muestras, sin embargo, un exceso de oxidante (>100 mg L⁻¹) promueve la formación de subproductos de reacción [31], los cuales no afectan en el análisis mediante cromatografía micelar electrocinética.

4.2. Validación de lo metodología analítica

La Tabla 5 presenta un resumen de los datos de linealidad, sensibilidad y precisión obtenidos por el método propuesto. Los valores fueron obtenidos del análisis de estándares de glicerol usando tartrazina como estándar interno. La respuesta señal glicerol vs. [glicerol] se utilizó para obtener la línea de calibrado a partir de la cual se obtuvieron los parámetros analíticos.

Tabla 5. Validación de los parámetros analíticos.

Parámetro	Valor
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	5.00 – 25.00
Sensibilidad analítica (Abs L mg ⁻¹)	5.337 ± 0.049
Ordenada al origen (Abs)	1.650 ± 0.034
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9965
Límite de detección LOD (mg L ⁻¹)	1.65 ± 0.77
Límite de cuantificación LOQ (mg L ⁻¹)	4.96 ± 1.54
Repetitividad (%RSD), n=3	
8 mg L ⁻¹	3.72
16 mg L ⁻¹	0.54
24 mg L ⁻¹	1.05
Reproducibilidad (%RSD), n=3	
8 mg L ⁻¹	5.48
16 mg L ⁻¹	2.67
24 mg L ⁻¹	3.69

Los resultados de precisión (%RSD) expresados como repetitividad y reproducibilidad fueron menores al 6.00%. A pesar de la complejidad de la matriz de las muestras, el pretratamiento y la necesidad de aplicar una metodología de análisis indirecta que requiere de una derivatización, los valores de %RSD son adecuados para la determinación de glicerol en muestras de biodiesel.

La exactitud del método, evaluada mediante la comparación en la cuantificación de glicerol en muestras de biodiesel obtenidas a partir de aceite vegetal de canola utilizando la metodología de referencia (espectroscopía

UV/Vis). Los resultados obtenidos del análisis de 8 muestras por ambas metodologías se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Contenido de glicerol en biodiesel (%m/m, %RSD, n=3) por la metodología propuesta (MEKC) y UV/Vis

Muestra	Glicerol (%m/m)	Glicerol (%m/m)	t_{exp}
	UV/Vis	MEKC	
1 ^{a)}	0.19(0.42)	0.18(1.33)	1.05
2 ^{a)}	0.18(0.14)	0.18(0.57)	1.30
3 ^{b)}	0.19(0.83)	0.19(0.57)	1.24
4 ^{b)}	0.19(0.73)	0.19(0.36)	1.59
5 ^{b)}	0.19(0.14)	0.19(0.66)	0.38
6 ^{a)}	0.13(0.39)	0.13(1.37)	1.86
7 ^{b)}	0.11(0.39)	0.12(0.54)	2.07
8 ^{a)}	0.14(0.48)	0.15(1.76)	1.29

a) Asumiendo varianzas desiguales $t_{crit} = 4.30$ (g.l. = 2, $\alpha = 0.05$)

b) Asumiendo varianzas iguales $t_{crit} = 2.78$ (g.l. = 4, $\alpha = 0.05$)

Se puede observar que la metodología por cromatografía micelar electrocinética es exacta en la determinación de glicerol para muestras de biodiesel a base de aceite vegetal de canola, ya que en todos los casos los valores de t_{exp} son menores a los valores de t_{crit} al 95% de confianza, lo que se traduce en que los porcentajes en peso de glicerol contenido en las muestras no presentan diferencias significativas con los obtenidos por la metodología de referencia.

La metodología propuesta ha sido validada como eficiente para la determinación de glicerol en biodiesel que permite cuantificar una concentración mínima glicerol de 0.06 %m/m. Las normas ASTM D6751 y EN14214 establecen un límite permisible igual o inferior al 24.00 – 25.00% en masa para la presencia de glicerol en biodiesel [25]. Por lo tanto, la metodología propuesta tiene la capacidad de evaluar las muestras de biodiesel y determinar si cumplen con los límites establecidos en las normativas mencionadas.

La Tabla 7 presenta un resumen de las técnicas oficiales empleadas en el análisis de glicerol. La metodología propuesta presenta alta precisión y exactitud en comparación con el método de referencia. Los costos y tiempos de análisis resultan moderados y su robustez y sensibilidad son apropiadas para la determinación de glicerol en muestras de biodiesel, lo que la sitúa como una alternativa viable frente a las metodologías convencionales.

Tabla 7. Comparativa de las metodologías estándares para la determinación de glicerol en biodiesel y la metodología propuesta.

Norma	Metodología	Reactivos	Condiciones de análisis	Tiempo de análisis	Desventajas	Alcances de análisis	Referencias
ASTM D6584 EN 14105	Cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID)	Solución de calibración de glicerol, mono, di y triglicéridos ASTM D6584. Estándar interno Butanetriol y Tricaprin. Agente derivatizante MSTFA. Hexano.	Extracción líquido-líquido agua-hexano. Columna TraceGold TG-5MT 15.0 mm x 0.25 mm x 0.1 µm. Detector FID 380°C Gas portador He	30 minutos	Elevados costos de instrumentación. Necesita un alto nivel de entrenamiento.	Métodos aplicables para concentraciones de glicerol de 0.05 % m/m. Precisiones menores al 3.5% (%RSD).	8, 9
ASTM D763	Titulación ácido-base de ácido fórmico formado por la oxidación con peryodato del glicerol mediante hidróxido de sodio	Soluciones amortiguadoras de pH 10 y 7. Soluciones de peryodato de sodio, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etilenglicol, tiosulfato de sodio e indicador azul de bromotimol. Hexano.	Extracción líquido-líquido agua-hexano. El agua debe llevarse a ebullición por 5 min para la eliminación de CO ₂ . La titulación debe realizarse en una disolución 1:30 etilenglicol-agua.	25 minutos	Interferentes como CO ₂ , glicoles, azúcares, etc. Baja precisión y exactitud	Método aplicable para concentraciones de glicerol de 0.13 % m/m. Precisión menor al 3.4% (%RSD).	10
ASTM D759	Cromatografía de intercambio iónico con detección de pulso amperométrico (IC-PAD)	Solución eluyente de Hidróxido de sodio. Solución de Hidróxido de potasio	Columna de intercambio aniónico Metrosep Carb-2 250.0 x 4.0 mm, 5µm. Precolumna Hamilton PRP-x100 20.0 x 4.0 mm, 10 µm. Detector de pulso amperométrico (PAD) 200 µA.	5 minutos	Elevados costos de instrumentación. Un exceso de NaOH aumenta el pH y varía la sensibilidad resultante en el pico de glicerol.	Método aplicable para concentraciones de glicerol entre 0.005 – 0.05 % m/m. Precisión menor al 5% (%RSD)	33
Metodología propuesta	Electroforesis capilar. Cromatografía micelar electrocinética (MEKC)	Electrolito de trabajo: SDS, Tetraborato de sodio. Soluciones de peryodato de sodio, tartrazina. Agente derivatizante MBTH. Diclorometano.	Extracción líquido-líquido agua-diclorometano. Capilar de sílice fundida 21.5 cm x 75 µm I.D, Agilent. Detector DAD. Corriente de separación 14 kV.	18 minutos	Costos moderados de instrumentación. Un exceso de oxidante produce la sobreoxidación del agente derivatizante.	Método aplicable para concentraciones de glicerol de 0.06 % m/m. Precisión menor al 6 % (%RSD)	-

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Se ha desarrollado y aplicado una metodología por cromatografía micelar electrocinética para la determinación indirecta de glicerol en biodiesel basada en la derivatización de formaldehído utilizando la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona como agente derivatizante. La metodología es eficiente para la separación y determinación de glicerol con tiempos de análisis menores a 20 minutos permitiendo una tasa de muestreo de 3 pruebas por hora, en comparación con las metodologías oficiales por GC (cerca de 2 análisis por hora). El método proporcionó una buena precisión instrumental con valores de %RSD menores al 6.00%, adecuados para la aplicación de la metodología.

Comparada con las metodologías oficiales, el enfoque de la metodología propuesta es más simple, rentable y conveniente ya que requiere un pretratamiento de la muestra y un uso de reactivos mínimo durante el procedimiento, con costos moderados y una sensibilidad aplicable a muestras de biodiesel esta metodología puede ser potencialmente utilizada como una alternativa para el análisis de glicerol en biodiesel.

REFERENCIAS

6. Referencias

- [1] Salinas Callejas, E., & Gasca Quezada, V. (2009). Los biocombustibles. *El cotidiano*, 75-82.
- [2] Demirbas, A. (2007). Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*, 35, 4661-4670.
- [3] Tejeda Tovar, C., Tejeda Benítez, L., Villabona Ortiz, Á., & Monroy Rodríguez, L. (2013). Obtención de biodiesel a partir de diferentes tipos de grasa residual de origen animal. *Luna Azul*, 11-21.
- [4] Alleman, T. L., & McCormick, R. L. (2016). *Biodiesel handling and use guide* (Quinta ed.). Estados Unidos: Nova Science Pub Inc.
- [5] Marchetti, J. M., & Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1300-1311.
- [6] Barbás, I., & Todorut, I. (2011). Biodiesel quality, standards and properties. En Montero, G (Ed.), *Biodiesel*, 4-16.
- [7] Ondul, E., & Dizge, N. (2014). Glycerol: a major by-product in the biodiesel manufacturing process. *The Institute of Natural & Applied Sciences*(19), 75-79.
- [8] American Society for Testing and Materials. (2022). *Standard test method for determination of total monoglycerides, total diglycerides, total triglycerides, and free and total glycerin in b-100 biodiesel methyl esters by gas chromatography*. (Norma ASTM D6584-21). Obtenido de <https://www.astm.org/d6584-21.html>.
- [9] European Standards. (2020). *Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (fame). Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents*. (Norma EN 14105).
- [10] American Society for Testing and Materials. (2015). *Standard test method for determination of glycerin assay by titration (sodium meta periodate)*. (Norma ASTM D 7637). Obtenido de <https://www.astm.org/d7637-10.html>
- [11] Pisarello, M. L., Dalla Costa, B. O., Veizaga, N. S., & Querini, C. A. (2010). Volumetric method for free and total glycerin determination in biodiesel. *Industrial Engineering Chemistry Research*(49), 8935-8940.
- [12] Santos, L. O., Rocha, S. F., Barra, C. M., Tubino, M., & Rocha Junior, J. G. (2022). A Simple, Rapid, and Reliable Titrimetric Method for the Determination of Glycerol at Low Concentration. *Brazilian Chemical Society*, 33(06), 530-540.
- [13] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica* (Novena ed.). D. F.: Cengage Learning.
- [14] Casas, A., Ramos, M. J., Pérez, A., Simón, A., & Lucas Torres, C. (2012). Rapid quantitative determination by ¹³C NMR of the composition of acetyl glycerol mixtures as byproduct in biodiesel synthesis. *Fuel*, 92, 180-186.

- [15] Lu, J., Wang, P., Wang, Q., Wang, Y., & Jiang, M. (2018). Validated ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance methods for the quantitative determination of glycerol in drug injections. *Molecules*, 23(5), 1117-1123.
- [16] Gojum, M., Valinger, D., Salic, A., & Zelic, B. (2022). Development of NIR-Based ANN models for on-line monitoring of glycerol concentration during biodiesel production in a microreactor. *Micromachines*, 13, 1590-1611.
- [17] Miltrea, L., Ranga, F., Fetea, F., Dulf Vasile, F., Rusu, A., Trif, M., & Vodnar, D. C. (2019). Biodiesel-derived glycerol obtained from renewable biomass-a suitable substrate for the growth of candida zeylanoides yeast strain ATCC 20367. *Microorganisms*, 16(8).
- [18] Spudeit, A., Piovezan, M. D., Azevedo, M., Vitali, L., & Leal Oliveira, M. A. (2013). Simultaneous determination of free and total glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis using multiple injection. *Electrophoresis*, 34(24), 3333-3340.
- [19] Noriega, A. B., Gomes, W. E., Sartotri, D. S., Mendes, R. K., & Etchegaray, A. (2019). Determination of free glycerol in biodiesel using uv-visible spectroscopy: a validation study. *Revista Virtual de Química*, 11(6), 624-535.
- [20] Luetkmeyer, T., Monteiro dos Santos, R., Barbosa da Silva, A., Salgado Amado, S., Viera, E., & D' Elia, E. (2010). Analysis of free and total glycerol in biodiesel using an electrochemical assay based on a two-enzyme oxygen-electrode system. *Electroanalysis*, 22(9), 995-999.
- [21] Faccendini, P. L., Ribone, M. É., & Lagier, C. M. (2014). Selective application of two rapid, low-cost electrochemical methods to quantify glycerol according to the sample nature. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193, 142-148.
- [22] Shimadzu. (2019). *Determination of Free and Total Glycerin in Biodiesel Methyl Esters – ASTM D6584 and EN14105*. Tokyo: Shimadzu Corporation. International Marketing Divisions.
- [23] Ahmed, M. A., Khan, I., Hashim, J., & Musharraf, S. G. (2015). Sensitive determination of glycerol by derivatization using HPLC-DAD method in Biodiesel Samples. *Analytical Methods*, 349-362.
- [24] Cozendey, A., Muniz, O., Santos, R. C., Souza, C. G., Andrade, D. F., & D'Ávila, L. A. (2021). Quantitative analysis of free glycerol in biodiesel using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Microchemical*, 168, 106-112.
- [25] Alfonso-Alvarez, J., A., Teón-Vega, A., Balderas-López, S., M. (2018). Obtención de biodiesel a partir de aceites usados en casa habitación de la comunidad del Refugio. *Energías Renovables*, 2(25), 31-40.
- [26] Miller J., N. & Miller J., C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. (Cuarta ed.) México: Pretience Hall.
- [27] Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure and Appl. Chem.*, 67(10), 1699-1723.

-
- [28] Durand G., Feger M., Pays M. (1974). Rapid estimation of small amounts of formaldehyde liberated during periodate oxidation of a sialoglycoprotein. *Analytical Biochemistry*, 61, 232-236.
- [29] Xu L. N., Gai F. Y., Mu F., Luan F. (2012). Determination of formaldehyde in aquatic products by micellar electrokinetic capillary chromatography with 2,4-DNPH derivatization. *Acta Chromatographica*. 4. 519-528.
- [30] Kandrak, M. (2018). Factors affecting the 2,4-dinitrophenyl hydrazine reaction with lipid carbonyls. [Tesis de maestría no publicada]. The State University of New Jersey.
- [31] Babu K. R., Kumari N. A., Vasundhara A., Lakshmi V. (2013). Spectrophotometric determination of penems in bulk and injection formulations by MBTH reagent. *International Journal of Engineering Research & Technology*. 4 (19). 2232-2237.
- [32] Castillo Rodríguez, M. A., Vázquez Revilla, A., López Arellano, R., & Rivera García, P. (2005). *Fundamentos de electroforesis capilar*. (Primera ed.). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- [33] American Society for Testing and Materials. (2015). *Standard test method for determination of free and total glycerin in biodiesel blends by anion exchange chromatography (Norma ASTM D 7591)*. Obtenido de <https://www.astm.org/d7591-12.html>