

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

"Validación de dos métodos cromatográficos: para determinar la composición de biogás y la concentración de ácidos grasos volátiles generados en un biodigestor anaerobio a diferentes de temperaturas y composiciones de sustrato"

Trabajo final de graduación para optar por el grado de
Licenciatura en Química

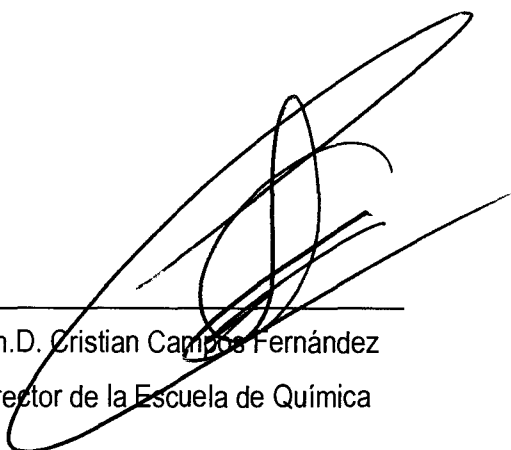
B.Q. Ivannia Jiménez Godínez

Ciudad Universitario Rodrigo Facio

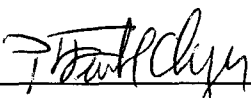
Costa Rica

2014

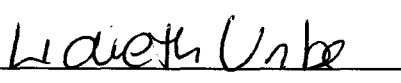
Este proyecto de graduación ha sido aceptado por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química.




Ph.D. Cristian Campos Fernández
Director de la Escuela de Química



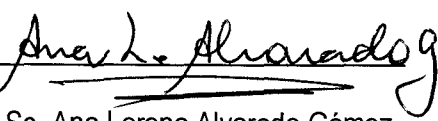
M.Sc. Paola Fuentes Schweizer
Directora del TFG



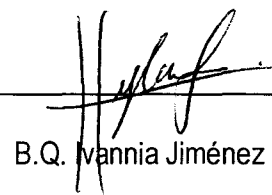
Dra. Lidieth Uribe Lorío
Asesora I



Ph.D. Max Chavarría Vargas
Asesor II



M.Sc. Ana Lorena Alvarado Gámez
Miembro del Tribunal



B.Q. Ivannia Jiménez Godínez
Postulante

Dedicatoria

A mis padres por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, sin importar cuales fueran.

A todas las personas, que me apoyaron, creyeron en mí e insistieron para que terminara esta tesis.

Agradecimientos

- A Dios por guiar mi vida hasta donde he llegado.
- A Msc. Paola Fuentes Schweizer, por su guía, apoyo e insistencia para que terminara esta tesis.
- A M.Sc. Lorena Uribe Lorío y Dra. Lineth Uribe Lorío, por su ayuda en elaboración y la revisión de la versión final del trabajo final de graduación.
- Al Ph.D. Max Chavarría Vargas, por su oportuna colaboración en la revisión del trabajo final de graduación.
- A Msc. Ana Lorena Alvarado Gámez, por su apoyo como miembro del tribunal revisor del trabajo final de graduación.
- A Eduardo Valerio y Lic. María Elena Sibaja por su ayuda y su asesoría técnica en las mediciones de las muestras del trabajo final de graduación.
- Al Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química de la Universidad de Costa Rica, a la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica y a sus directores respectivos directores Ph.D. Carlos León Rojas y Ph.D. Cristian Campos Fernández, por permitir que llevara a cabo los experimentos en sus instalaciones.
- A Lic. Mariana Murillo Roos por el excelente trabajo que efectuó con el proyecto del que forma parte este trabajo final de graduación.
- A mis papás por enseñarme que para conseguir lo que sea en la vida hay que trabajar duro.
- A Lic. Diana Robles Chaves y BQ. Sol Gutiérrez Álvarez por estar siempre apoyarme en el transcurso de mi carrera.
- Al Lic. Víctor Arias Mora y Msc. Carlos Calderón Castro, por su apoyo, consejos e insistencia para la culminación de esta tesis.

Tabla de contenidos

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de figuras	vi
Índice de cuadros	ix
Índice de abreviaturas	xi
Resumen	xii
1. Introducción	1
1.1. Historia del uso del biogás	1
1.2 Principales características de los biodigestores	2
1.3 Producción de biogás por digestión anaerobia	2
1.4 Métodos utilizados para la determinación de ácidos grasos volátiles	7
1.5 Producción de biogás	8
1.6 Validación de métodos de cuantificación	9
1.7. Cromatografía de gases	10
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
2. Sección experimental	12
2.1 Diseño del experimento	12
2.2 Equipos	13
A. Determinación de la composición de biogás	13
B. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles	15
2.3. Reactivos y cristalería	16
A. Determinación de la composición de biogás	17
B. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles	17
2.4. Metodología	19
A. Muestreo y almacenamiento de las muestras	19
B. Análisis de las muestras:	19

C. Condiciones de operación de los equipos cromatográficos _____	22
2.5. Validación de los métodos cromatográficos _____	22
3. Resultados y discusión de la validación de los métodos cromatográficos _____	26
3.1 Composición del biogás _____	26
A. Optimización de la columna cromatográfica _____	27
B. Determinación del factor de respuesta _____	27
C. Figuras de mérito _____	28
3.2 Concentración de ácidos grasos volátiles _____	32
4. Resultados de la medición de las muestras de los biodigestores _____	47
4.2. Composición del biogás _____	50
4.3 Comparación de condiciones mesofílicas, termofílicas y los diferentes sustratos _____	57
5. Conclusiones y recomendaciones _____	63
Bibliografía _____	67
ANEXO 1. Áreas de los cromatogramas obtenidos para la determinación de la composición de biogás _____	I
ANEXO 2. Composición de biogás para cada condición de operación de los biodigestores durante el experimento _____	II
ANEXO 3. Tablas con resultados de las concentraciones de AGV de las muestras _____	III
ANEXO 4. Distribución de probabilidad de los datos de % de CH₄ y % CO₂ de los diferentes experimentos entre la semana 9 hasta la 15 _____	IV
ANEXO 5. Gráficos de residuales y de distribución de los datos por temperatura y composición de sustrato para el análisis de las diferencias en el % de CH₄ _____	VIII
ANEXO 6. Estructuras químicas del glucano, xilano y lignina _____	IX
ANEXO 7. Cromatogramas de las muestras de biogás analizadas. _____	X
ANEXO 8. Gráficos de residuales para las curvas de regresión lineal. _____	XII

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de las etapas de la digestión anaerobia. ²²⁻²⁴	4
Figura 2. Hidrólisis de aminoácidos y esquema de la formación de los productos de la primera fase de la digestión anaerobia. ^{25,26}	5
Figura 3. Estructura química de los ácidos grasos volátiles de interés, punto de ebullición y solubilidad en agua.	7
Figura 4. Esquema de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama. ⁵⁷	10
Figura 5. Prototipo del biodigestor utilizado.	13
Figura 6. a) Bolsa y sistema de bombeo utilizado para la toma de muestras de biogás. b) bolsa conectada directamente al biodigestor.	14
Figura 7. Esquema de una columna de tamiz molecular.	15
Figura 8. a) Cromatógrafo utilizado en la determinación de la composición de biogás. b) Cromatógrafo utilizado en la determinación de la concentración de AGV	16
Figura 9. Tratamiento previo a la inyección en el cromatógrafo de las muestras de los lodos de los biodigestores para determinar ácidos grasos volátiles.	21
Figura 10. Cromatograma obtenido durante la optimización del método para la determinación de la composición de biogás a 100 °C, modo isotérmico.	26
Figura 11. Cromatograma obtenido después de la optimización de las condiciones de operación, rampa 100 °C durante 4 minutos 15 °C /min hasta 200 °C, inyector a 200 °C y detector a 230 °C	27
Figura 12. Cromatograma de un patrón de AGV obtenido después de la optimización del método, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa.	32
Figura 13. Curva de calibración del ácido acético con un rango de concentración entre 100 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un %CV de 6 %.	35
Figura 14. Curva de calibración del ácido propanoico con un rango de concentración entre 100 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 5 %.	36

Figura 15. Curva de calibración del ácido butírico con un rango de concentración entre 100 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 10 %.	37
Figura 16. Curva de calibración del ácido acético con un rango de concentración entre 200 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 6 %.	38
Figura 17. Curva de calibración del ácido propanoico con un rango de concentración entre 200 mg/L hasta 500 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 5 %.	39
Figura 18. Curva de calibración del ácido butírico con un rango de concentración entre 200 mg/L hasta 500 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 10 %.	40
Figura 19. Curva de calibración del ácido acético con un rango de concentración entre 3 000 mg/L hasta 10 000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con % CV de 6 %.	41
Figura 20. Curva de calibración del ácido propanoico con un rango de concentración entre 3 000 mg/L hasta 10 000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 5 %.	42
Figura 21. Curva de calibración del ácido butírico con un rango de concentración entre 3 000 mg/L hasta 10 000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H ₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N ₂ 100 kPa, con un % CV de 10 %.	43
Figura 22. Gráficos de la concentración de los AGV de interés y totales obtenidos durante el desarrollo del experimento A) ácido acético, B) ácido propanoico y C) ácido butanoico, a las diferentes condiciones de operación	49
Figura 23. Composición del biogás a lo largo del desarrollo del experimento A) Metano, B) Dióxido de carbono, a las diferentes condiciones de operación	52
Figura 24. Productividad diaria de los sistemas en relación a la composición de los sustratos	54
Figura 25. Productividad diaria de los sistemas en relación a la temperatura	56

Figura 26. Condiciones en las cuales se obtuvieron el mayor porcentaje de metano en el biogás_	57
Figura 27. Distribución de todos los datos de porcentaje de CH ₄ a partir de la semana 9 hasta la semana 15 _____	59
Figura 28. Resultados de la prueba de Friedman y Kruskal y Wallis para el porcentaje de metano de los seis tratamientos diferentes de operación. _____	60
Figura 29. Gráfico de barras de los resultados del análisis estadístico para la composición de metano de los seis tratamientos estudiados _____	61
Figura 30. Estructura molecular del glucano. _____	IX

Índice de cuadros

Cuadro I. Métodos de tratamiento de muestra y cuantificación de AGV reportados en la literatura. ..	8
Cuadro II. Algunos métodos reportados en la literatura para la determinación de la composición de biogás.	9
Cuadro III. Composición de los sustratos y temperaturas utilizadas para el funcionamiento de los biodigestores.	12
Cuadro IV. Concentración de las disoluciones madre de cada uno de los AGV a partir de las cuales se prepararon los patrones de las curvas de calibración.	17
Cuadro V. Preparación de los patrones de AGV y estándar interno para la preparación de las curvas de calibración.	18
Cuadro VI. Condiciones de operación del cromatógrafo para la determinación de la composición de biogás y para la cuantificación de ácidos grasos volátiles.	22
Cuadro VII. Curvas de calibración que se prepararan para verificar el rango y la linealidad de cuantificación de AGV.	24
Cuadro VIII. Temperaturas del horno y del inyector-detector utilizadas para evaluar la robustez del método de cuantificación de ácidos grasos volátiles.	25
Cuadro IX. Factores de respuesta obtenidos para los gases analizados por el método para la determinación de biogás.	27
Cuadro X. Valores de coeficiente de variación e intervalo de confianza obtenido para la determinación de la composición de biogás durante el funcionamiento de los biodigestores.	29
Cuadro XI. Resultados de la medición del patrón de gas de refinería lote: 112PLU1SPC10D, con el método para la determinación de la composición de biogás.	30
Cuadro XII. Valor de t student de contraste de datos emparejados y F para diferentes flujos de gas para el método de determinación de la proporción de biogás.	31
Cuadro XIII. Porcentajes de recuperación obtenidos para los AGV, después de ser extraídos con éter etílico.	33

Cuadro XIV. Valores de t de student obtenidos para evaluar la correlación de las curvas de calibración para la cuantificación de ácido acético, propanoico y butírico por cromatografía de gases.	34
Cuadro XV. Resultados de % CV e intervalo de confianza de la evaluación de precisión.....	44
Cuadro XVI. Límites de detección del método para la determinación de AGV según el rango de trabajo, según Miller y Miller, 2002.	45
Cuadro XVII. Resultados de la evaluación del efecto de la temperatura sobre el método para determinación de AGV.....	46
Cuadro XVIII. Caracterización de los sustratos utilizados para el establecimiento de los reactores al inicio del ensayo. ⁷⁴	53
Cuadro XIX. Diseño de experimento propuesto para la evaluación de la robustez del método para la evaluación de la composición de biogás.	66
Cuadro XX. Diseño de experimento propuesto para la evaluación de la robustez del método para la cuantificación de AGV.	66

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado	Traducción
AGV	Ácidos grasos volátiles	NA
THR	Tiempo de residencia hidráulico	NA
FID	Flame ionization detector	Detector de ionización de llama
TCD	Thermal conductivity detector	Detector de conductividad térmica

Resumen

Se validaron dos métodos de cromatografía de gases, uno para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y otro para la proporción de CH₄ y CO₂ en biogás.

El objetivo de las validaciones fue caracterizar la producción de biogás de biodigestores que operaban a 50 °C y 35 °C, y con tres diferentes composiciones de sustrato: 100 % estiércol, 90% estiércol - 10 % residuos de comida y 80 % estiércol - 20 % residuos de comida.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente para verificar que presentaban una distribución normal, la distribución de los datos no fue normal, por lo tanto se aplicó estadística no paramétrica, y se aplicaron una prueba de análisis de varianza de dos factores para datos no normales la prueba de Friedman y la de Kruskal y Wallis, con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre el biogás producido a diferentes condiciones de operación de los biodigestores. Los resultados obtenidos indicaron que no existe diferencia significativa entre la composición de biogás obtenido para las seis condiciones de operación.

A pesar que estadísticamente los resultados no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos utilizados, se pudo comprobar que la variabilidad de los resultados obtenidos para los biodigestores que operaron a 35 °C fue mayor que para los que operaron a 50 °C, además que los resultados promedio de porcentaje de metano de los biodigestores que operaron a 50 °C son mayores y muy constantes. Sumado a la estabilidad de los biogestores, se concluyó que los que presentaron mayores porcentajes de residuos de comida en su composición rindieron con una mayor productividad de biogás.

Con base en los resultados se recomienda adoptar como condiciones de operación las que se desarrollaron a 50 °C y con una composición de sustrato de 80 % estiércol y 20 % residuos de comida.

1. Introducción

La búsqueda de alternativas energéticas ha despertado gran interés en la obtención de energía a partir de biogás. El biogás se define como una mezcla de gases; principalmente metano y dióxido de carbono; producidos por la digestión anaerobia bacteriana de residuos orgánicos. La composición del biogás, oscila entre 40 % - 70 % metano y 30 % - 60 % dióxido de carbono. El contenido de metano es irregular y existen otros gases en menor proporción como hidrógeno, amoníaco y disulfuro de hidrógeno, que pueden estar presentes en el biogás. ^{1,2}

Además del beneficio de la producción de energía, el uso de la digestión anaerobia es una estrategia para el manejo de los residuos sólidos, especialmente los agrícolas. ^{3,4,5} El control de la contaminación, la producción de energías renovables y la obtención de materiales como fertilizantes, son parte de los beneficios colaterales de la generación de biogás. ⁶

1.1. Historia del uso del biogás

El uso de biogás se remonta al siglo VII; desde entonces, en China y Persia se empleaba para calentar baños; sin embargo fue hasta el siglo XIX, que se investigó la naturaleza de la producción de biogás. Se descubrió que ciertos microorganismos eran responsables de la digestión anaerobia, y que el ión acetato era el principal precursor en la generación de metano. La primera planta generadora de biogás fue construida en la India en 1859, y para 1895 en Inglaterra, las lámparas de las calles eran alimentadas con biogás. ^{7,8}

Uno de los países que utiliza biogás como una fuente importante de energía es China, donde se aprovechan los residuos agrícolas para producirlo y abastecer de energía a la población rural. Kenia, Polonia, Dinamarca, Uganda e India, también utilizan biogás como alternativa a la leña, el carbón y los combustibles fósiles. ⁹⁻¹²

Los sistemas que producen biogás a partir de digestión anaerobia se denominan biodigestores. En el siglo XX el auge de los combustibles fósiles disminuyó el desarrollo de estos sistemas; sin embargo la necesidad actual de fuentes de energía alternativas y del manejo eficiente de los

residuos agrícolas e industriales, ha impulsado el uso de la digestión anaerobia como fuente de energía renovable. ¹³⁻¹⁵

1.2 Principales características de los biodigestores

Los biodigestores consisten en un recipiente cerrado, diseñado para favorecer el ambiente anaerobio; equipado con tuberías de alimentación (influyente) y descarga (efluente), y bombas (si es necesario) para transportar el biogás. ^{16,17} Según la forma en que operan, se clasifican en continuos, por lotes o semicontínuos; la preferencia sobre alguna de estas formas depende del objetivo que se busque y del tiempo de residencia hidráulico (TRH), es decir el tiempo en el que el biodigestor está en funcionamiento. ³

El biogás que producen es fuente de energía para actividades cotidianas como el transporte, cocción de alimentos y generación de energía eléctrica; además el biol, que es el líquido remanente del biodigestor, se utiliza como fertilizante. ¹⁸⁻²⁰

1.3 Producción de biogás por digestión anaerobia

La degradación anaerobia, es un proceso biológico, en el que parte de la materia orgánica de un sustrato se descompone para producir metano y dióxido de carbono (biogás), entre otros compuestos. La optimización de este proceso en ambientes anaerobios, permite el aprovechamiento de los desechos para producir energía. Los biodigestores se monitorean, para obtener productos con características deseables. ^{6,16}

La degradación anaerobia de materia orgánica consta de varias etapas de carácter simbiótico, entre bacterias sensibles o que se inhiben completamente en presencia de oxígeno u otros oxidantes fuertes. Durante la digestión se da una serie de procesos de oxidación y reducción, en los cuales el aceptor final de electrones es una molécula inorgánica. Las bacterias responsables del proceso lo efectúan por medio de una cadena transportadora de electrones, similar a la que las mitocondrias poseen en la respiración aeróbica; los aceptores de electrones pueden ser CO_2 , SO_4^{2-} o NO_3^- . ^{6,21}

Cuando el CO_2 acepta los electrones libres, se reduce a gas metano, este proceso se denomina metanogénesis hidrogenotrófica, y generalmente se le atribuye cerca del 30 % de la producción total de metano. A partir del CO_2 , algunos microorganismos junto con el H_2 producen ácido acético, el ión sulfato se reduce a H_2S y el ión nitrato se reduce a N_2 .^{6,15} En la digestión anaerobia, cerca del 90 % de la energía disponible por oxidación directa se transforma en metano y un 10 % se consume en el crecimiento bacteriano. El orden de las etapas de la digestión anaerobia se resume en la

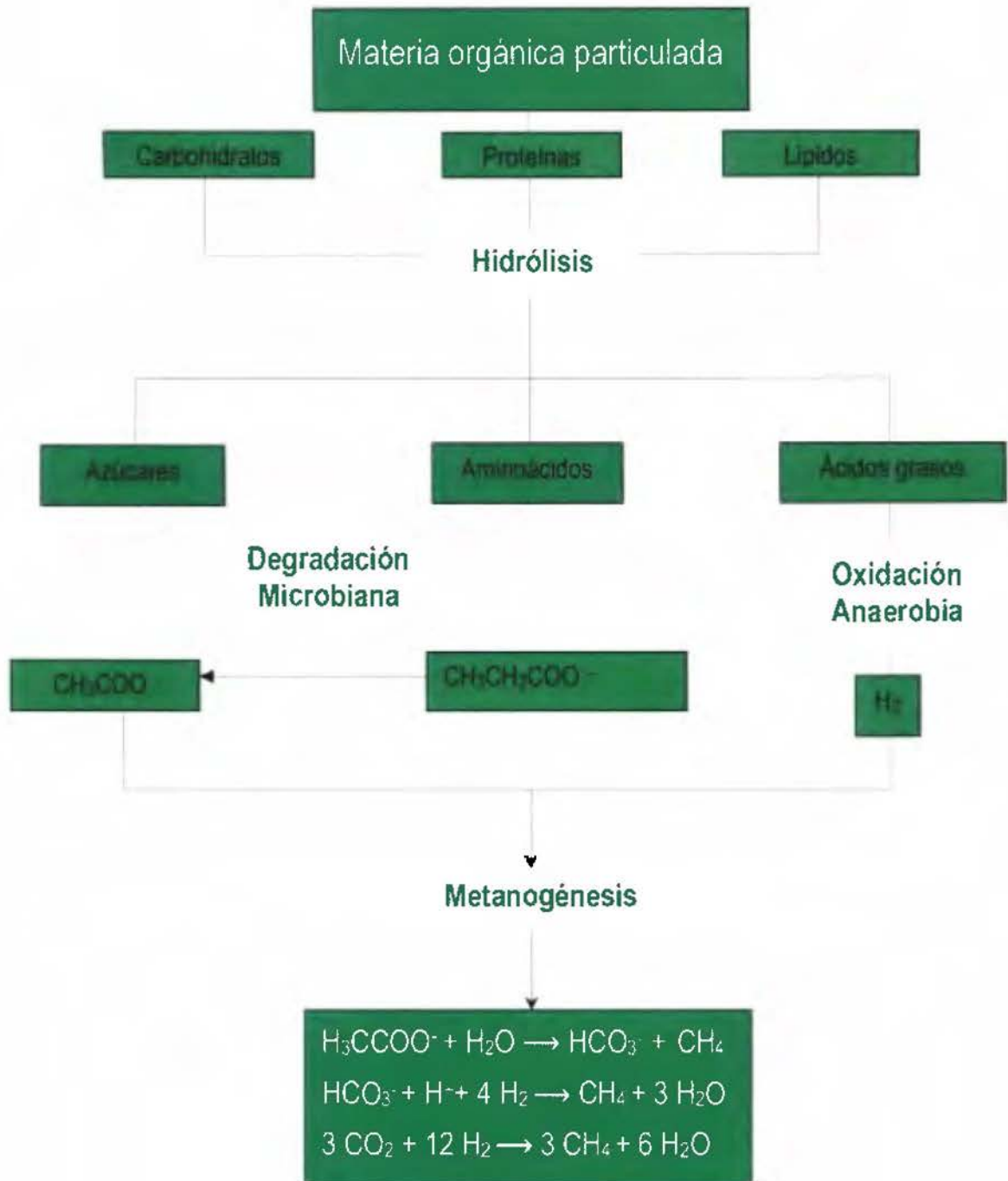


Figura 1. Esquema de las etapas de la digestión anaerobia. ²²⁻²⁴

En la primera fase, de carácter enzimático, se hidrolizan moléculas grandes, como proteínas, carbohidratos y lípidos. Las enzimas responsables del proceso son extracelulares, propias de microorganismos acidogénicos. El objetivo de esta etapa es degradar las moléculas complejas en otras más sencillas como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos, alcohol, hidrógeno, dióxido de carbono. La hidrólisis depende de la cantidad de sólido del sustrato, la temperatura, el tiempo de producción, la composición química del sustrato y el pH.^{25,26}

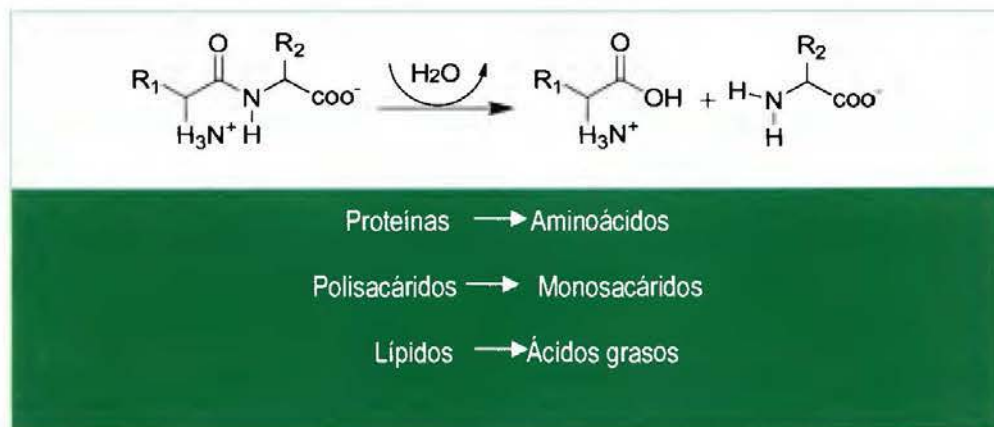


Figura 2. Hidrólisis de aminoácidos y esquema de la formación de los productos de la primera fase de la digestión anaerobia.^{25,26}

Las proteínas, son fuente de carbono y energía, y sus moléculas base, los aminoácidos son fuente de nutrientes. Las enzimas responsables de la hidrólisis proteica se conocen como proteasas. Parte de los aminoácidos se integran como material celular y el resto forma AGV (ácidos grasos volátiles), CO₂; H₂, NH₄⁺ y S²⁻. La hidrólisis es lenta y por tanto limitante del proceso de generación de biogás.^{6,20}

La degradación tiene origen microbiano y genera compuestos que pueden ser aprovechados por los microorganismos como los iones propionato (H₃CH₂CCOO⁻), butirato (H₃CH₂CH₂COO⁻) y acetato

(H_3CCOO^-). La oxidación de los ácidos grasos volátiles genera ión acetato, dióxido de carbono e hidrógeno; el proceso es espontáneo, tiene un valor de energía libre de Gibbs de aproximadamente -436 kJ/mol .^{22,27} En la etapa acetogénica, se metaboliza el ácido acético y otros subproductos como el H_2 , las bacterias acetogénicas se encargan de transformar los productos como el ácido propanoico y butanoico, a productos como acetato e H_2 .^{28,14}

En la etapa final o metanogénesis, los microorganismos metanogénicos utilizan ión acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, para formar metano. La producción de biogás depende de la descomposición de ión acetato, y este a la vez de la oxidación de ácidos grasos de cadena corta. El monitoreo de la concentración de los AGV, es importante, pues son indicadores de actividad bacteriana y la concentración de estos, altera el pH. Si el pH es menor a 7 se inhibe la metanogénesis, disminuyendo o inhibiendo la producción de metano.^{25,29}

Los ácidos grasos volátiles, son moléculas orgánicas que presentan el grupo funcional carbonilo, son ácidos relativamente estables debido a la resonancia de este grupo, y su pKa es de aproximadamente 5, es decir son ácidos débiles, y moléculas relativamente polares y miscibles con el agua.^{30,31}

En la figura 3, se observa la estructura de los principales AGV producidos por degradación anaerobia, así como las características fisicoquímicas que explican la solubilidad de estos en medios acuosos, y cuáles deberían ser las condiciones para la separación de estos de una matriz acuosa por medio de la destilación. Dentro del rumen del ganado, se generan AGV que constituyen una de las principales fuentes de energía para los animales. El ácido acético, es producido durante la digestión de los carbohidratos y se utiliza para sintetizar los ácidos grasos de la leche. El ácido propanoico, es producido a partir de almidón y azúcar, por bacterias degradadoras de pectina; constituye entre el 15 % y 30 % de los ácidos grasos volátiles, se utiliza para sintetizar glucosa. El ácido butírico, se genera a partir del desdoblamiento de los carbohidratos estructurales y los azúcares, y representa entre el 5 % y el 15 %. El estiércol de vaca como sustrato, acarrea microorganismos que sintetizan AGV.^{32,33}

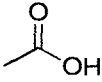
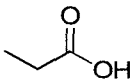
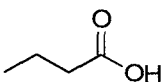
		
Ácido acético	Ácido propanoico	Ácido butírico
118 °C	141 °C	162 °C
Soluble en agua	Soluble en agua	Soluble en agua

Figura 3. Estructura química de los ácidos grasos volátiles de interés, punto de ebullición y solubilidad en agua.

La implementación de experimentos de biodegradabilidad a escala de laboratorio, permite evaluar las condiciones de operación y el potencial para producir biogás de diferentes sustratos. El monitoreo de la producción de biogás por medio del control de los intermediarios como los ácidos grasos volátiles, favorece el control de la producción de metano. ³⁴

1.4 Métodos utilizados para la determinación de ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles, son de interés para varios procesos industriales, como el control de calidad de alimentos y en el tratamiento de aguas residuales ^{22,23,25}. La forma más sencilla para monitorear en línea los biodigestores, es midiendo el pH, pues se considera un indicador de la concentración de ácidos grasos volátiles. ²⁹ Pero si se quiere determinar la cantidad individual de los ácidos grasos como el ácido acético, propanoico y butírico, la cromatografía de gases es la mejor técnica. Se han implementado otros métodos, el Cuadro I, resume algunas investigaciones en las que se ha reportado el análisis de ácidos grasos volátiles en diferentes matrices ^{29,35,36}.

Cuadro I. Métodos de tratamiento de muestra y cuantificación de AGV reportados en la literatura.

Método	Tratamiento previo	Técnica
Aguas residuales con alto contenido salino ³⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Espaciado de cabeza • Liofilización • Ajustar el pH hasta aproximadamente 3. • Extracción con disolventes (dicloro metano, heptano, diétil éter y diisopropil éter). • Congelar 48 h. 	GC - FID, He como gas portador y método del estándar interno.
Aguas de cultivo de peces ³⁶	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración 	GC - FID, N ₂ como gas portador y método del estándar interno
Quesos rayados ³⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Homogenizar en con agua • Filtrar y ajustar el pH hasta aproximadamente 3 • Saturar con NaCl y extraer con etil éter 	GC - FID, He como gas portador y método del estándar interno
Aguas de plantas de digestión anaerobia ³⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Dilución 	Potenciométrico, electrodo de vidrio , HCl 0,1 mol /L como valorante - correlacionado GC
Análisis en línea de AGV por reprivatización ⁴⁰	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatización de los AGV con N-(1-naftil) ethilenediamina • Extracción del producto derivatizado con metiliterbutileter 	Espectrofluorómetro (λ335 nm y λ395 nm)
Aguas residuales de granjas porcinas y en queso de oveja ⁴¹	<ul style="list-style-type: none"> • Alícuota • Agitación y micro extracción en fase sólida (25 °C por 30 min) • Desorción en el GC 	Fibra de divinilbenceno y GC - masas
Residuos agroindustriales ⁴²	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugar • Filtrar con filtro de celulosa de 0,45 μm 	HPLC- refractómetro, H ₂ SO ₄ como fase móvil
Aguas de origen volcánico ⁴³	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrar y eluir a través de una columna de intercambio iónico 	CL, detector de conductividad

1.5 Producción de biogás

La producción de biogás, depende de muchos factores, como las características del sustrato, el pH, la temperatura, la agitación en el biodigestor, el tamaño de partícula, el clima y el tiempo de residencia hidráulico (TRH), entre otros. A pesar del estado físico, actualmente el análisis de biogás, no es complejo. Debido a la capacidad de la cromatografía de gases de brindar información, tanto cualitativa como cuantitativa, es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de mezclas complejas de gas. ⁴⁴ El Cuadro II, resume algunos métodos utilizados para determinar la composición del biogás.

Cuadro II. Algunos métodos reportados en la literatura para la determinación de la composición de biogás.

Método	Comentarios
Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica ^{16,29,45,46}	Es el más utilizado, es versátil y las condiciones se pueden aplicar a la determinación de otros analitos como hidrocarburos de cadena corta.
Aparato de Orsat ⁴⁷	Requiere trabajar a temperatura y presión controladas, además utiliza indicadores lo cual no lo hace versátil
Analizadores de biogás ⁴⁸	Especializados para analizar biogás, alta sensibilidad, poco versátiles pues son Específicos

1.6 Validación de métodos de cuantificación:

En química analítica, se busca generar valores que hayan sido sometidos a criterios de aceptación, con el fin de garantizar que los resultados son correctos. Debido a ello los métodos de análisis deben ser validados, lo que implica someterlos a una serie de pruebas que demuestran de forma objetiva la validez de los datos que se obtiene tras su aplicación. El periodo de validación dependerá de la complejidad de la técnica, la matriz y de las características propias de los analitos, como su estabilidad y propiedades fisicoquímicas. ⁴⁹

Para validar un método se utilizan ciertos parámetros analíticos o figuras de mérito. Entre los principales están: la precisión, exactitud, selectividad o especificidad, el límite de detección, límite de cuantificación, la linealidad, el rango de trabajo, el porcentaje de recuperación, la estabilidad y especificidad. Cada uno de estos parámetros se evalúa estadísticamente. ⁵⁰ Obtener valores aceptables de las figuras de mérito, garantiza que los resultados son fidefignos.⁵¹

Los métodos analíticos pueden ser cualitativos o cuantitativos; según el tipo se establece las figuras de mérito que deben ser tomadas en cuenta para la validación de los métodos. El caso de métodos cuantitativos, se recomienda validar la especificidad, el límite de detección, la precisión y la estabilidad, en el caso de métodos cuantitativos se recomienda la validación de la especificidad, el límite de detección, la precisión, linealidad y ámbito de trabajo, la exactitud, el porcentaje de recuperación, la estabilidad, incertidumbre de la medición, el límite de cuantificación y la robustez.⁵²

Los métodos analíticos desarrollados se clasifican como métodos no normalizados, si se desarrollaron a partir de otros publicados en notas técnicas o artículos científicos, y normalizados si se implementa un método publicado por entidades de referencia.⁵³

1.7. Cromatografía de gases:

Es una técnica de separación, en la que una fase móvil gaseosa arrastra a los analitos a través de un soporte sólido, con el que interactúan fisicoquímicamente, la diferencia en las velocidades de migración de los componentes de la muestra, es la responsable de la separación de los analitos. Esta técnica, se desarrolló en los años cincuenta, y actualmente es utilizada en múltiples campos como la industria farmacéutica, alimenticia y el análisis ambiental, principalmente para control de calidad.^{54,55}

Dependiendo de la afinidad de las sustancias con la fase estacionaria, así será el tiempo de residencia de los mismos, es decir el tiempo entre la inyección y la detección. En esta técnica, las muestras deben ser volátiles y térmicamente estables. La figura 4, muestra el esquema básico de un cromatógrafo de gases.⁵⁶

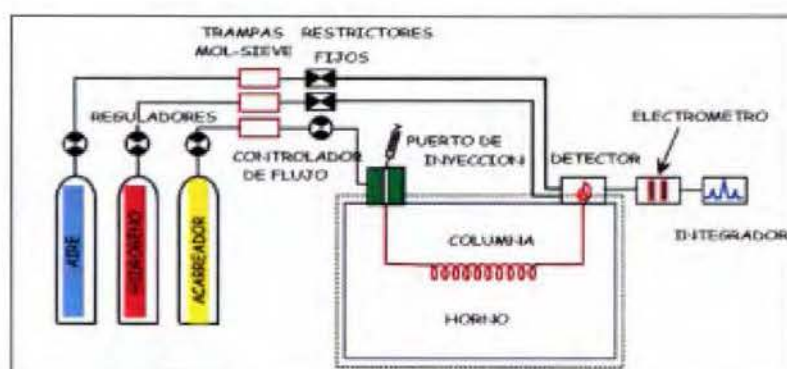


Figura 4. Esquema de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama.⁵⁷

❖ **Objetivo general:** validar dos métodos de cromatografía de gases, uno para la determinación de la composición de biogás y otro para la cuantificación de ácidos grasos volátiles generados en biodigestores que operan a diferentes condiciones.

❖ **Objetivos específicos:**

1. Validar un método de cromatografía de gases para la determinación de la composición de biogás generado por seis biodigestores que trabajan a dos condiciones de temperatura y tres de composición de sustrato.
2. Desarrollar un método de tratamiento del supernatante de seis diferentes biodigestores para extraer los ácidos grasos volátiles presentes en estos.
3. Validar un método de cromatografía de gases para la cuantificación de ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propanoico y ácido butírico) en el supernatante de seis biodigestores.
4. Analizar estadísticamente los resultados de los métodos cromatográficos validados para concluir cuáles condiciones de temperatura y composición de sustrato son las mejores para la producción de biogás.

2. Sección experimental

El presente capítulo describe las condiciones experimentales optimizadas para el diseño del experimento, la determinación cromatográfica de la composición de biogás y la concentración de ácidos grasos volátiles.

2.1 Diseño del experimento:

A. Factores del diseño de experimento: se trabajó con dos factores la temperatura y la composición del sustrato del biodigestor, el primer factor se dividió en dos tratamientos y el segundo en tres. ⁵⁸ Cada experimento se trabajó por duplicado; el Cuadro III, resume las composiciones de sustrato y las temperaturas utilizadas en el experimento.

Cuadro III. Composición de los sustratos y temperaturas utilizadas para el funcionamiento de los biodigestores.

Temperatura (°C)	Mezclas de sustrato (% fracción de masa volumen)
35 y 50	50 boñiga de vaca y 50 gallinaza
35 y 50	40 boñiga de vaca , 40 gallinaza y 20 restos de comida
35 y 50	45 boñiga de vaca , 45 gallinaza y 10 restos de comida

Los biodigestores se construyeron en botellas de vidrio con capacidad de 1 L y selladas herméticamente (Figura 5); en ellas se colocó las mezclas de sustrato y agua necesaria para alcanzar 500 mL de volumen y una concentración de 5 % fracción de masa y volumen.



Figura 5. Prototipo del biodigestor utilizado.

Los biodigestores se mantuvieron en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica; ahí se prepararon los sustratos, y se construyeron los biodigestores y se controlaron algunas variables del desempeño de los mismos, como el pH, sólidos totales, y el volumen de gas producido. Los experimentos se dividieron en dos fases, la primera con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de veinte días y la segunda de ochenta y dos días.

2.2 Equipos

A. Determinación de la composición de biogás:

- Muestreo: las muestras se tomaron directamente de los biodigestores, por medio de bolsas especializadas para muestrear gases, denominadas Bag Sample PDVF y un sistema de bombeo, que muestra la figura 6. Se comprobó que el sistema genera presión suficiente para llenar las bolsas sin ayuda de la bomba, pero esa presión es superior a la que los sellos de los biodigestores podían soportar ⁵⁹

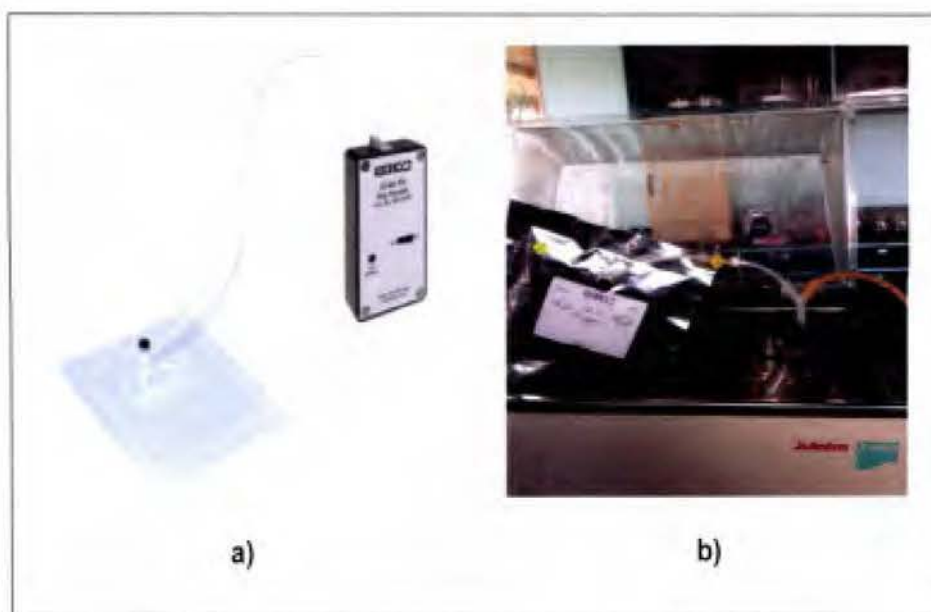


Figura 6. a) Bolsa y sistema de bombeo utilizado para la toma de muestras de biogás. b) bolsa conectada directamente al biodigestor.

Análisis del biogás: los análisis de composición del biogás se efectuaron en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo del Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (C.E.L.E.Q) de la Universidad de Costa Rica. El cromatógrafo de gases utilizado fue un HP 6800 (ver figura 8) con detector FID (detector de ionización de llama) y TCD (detector de conductividad térmica) y una columna Carboxen -1010 PLOT (tubular abierta de capa porosa), 30 m x 0,53 μm I.D (25467), de tipo capilar abierta, de sílice fundida, tipo de tamiz molecular. La separación en ese tipo de columnas, se relaciona con el tamaño de las moléculas, como lo ejemplifica la Figura 7.

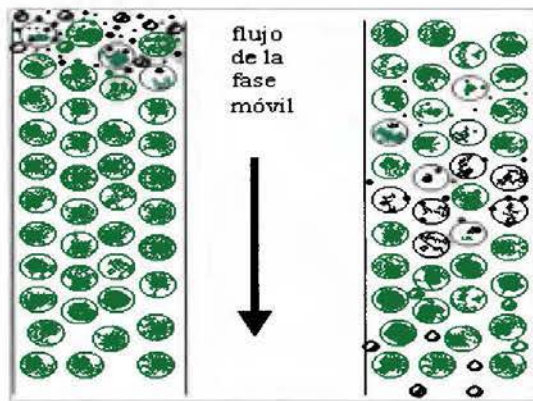


Figura 7. Esquema de una columna de tamiz molecular.

B. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles:

- Cuantificación de ácidos grasos: se utilizó el cromatógrafo de gases Shimadzu GC-8 A (ver figura 8), del cuarto de instrumentos de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, y una columna Alltech ECONO - CAP EC-WAX de 30 m (longitud) x 0,25 mm (diámetro interno) x 0,25 μm y un detector de ionización de llama (FID) con N_2 como gas de arrastre, y aire e hidrógeno para generar la llama del detector.
- Extracción de los ácidos grasos volátiles: se utilizó una centrifuga modelo Clay Adams safeguard NJ07054.



Figura 8. a) Cromatógrafo utilizado en la determinación de la composición de biogás (Centro de Electroquímica y Energía Química de la Universidad de Costa Rica). b) Cromatógrafo utilizado en la determinación de la concentración de AGV (Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica).

2.3. Reactivos y cristalería

A. Determinación de la composición de biogás:

- Gas de arrastre para el análisis cromatográfico: se utilizó nitrógeno y helio de alta pureza. Para el análisis de las muestras solo se utilizó nitrógeno.
- Patrón certificado de gases: se utilizó un patrón certificado de gases, marca Agilent Technologies; tipo gas de refinería, de 1 L de capacidad, con una presión de 207 kPa a 21 °C, número de lote: 112PLU1SPC10D. Cuyas concentraciones en % de moles son: 5,00 % de dióxido de carbono, 15,00 % de hidrógeno y 5,00 % metano. Las inyecciones se realizaron con una jeringa para gases de 250 μ L, la cual se purgo previamente 3 veces con aire y 3 veces con la muestra antes de realizar cualquier inyección.

B. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles:

- Extracción de ácidos grasos volátiles: se utilizó ácido clorhídrico al 1% fracción de volumen, preparado a partir de ácido clorhídrico concentrado y agua destilada; cloruro de sodio 99 % puro y éter etílico grado para análisis.
- Cuantificación de ácidos grasos: se utilizó patrones de ácido acético, propanoico, butírico y hexanoico. El ácido acético utilizado fue de marca Chem Service, presentación de 10 g y 99,5 % puro; el ácido propanoico y el butírico utilizados fueron marca Fluka Analytical, ambos con pureza del 99,0 %. El estándar interno utilizado fue ácido hexanoico 99 % puro, marca JT Baker. Para la preparación de los patrones se utilizaron balones aforados de vidrio de 100,00 mL; 50,00 mL; 25,00 mL y 10,00 mL y una micropipetasmrca Accumax de 100 μ L – 1000 μ L, y de 1000 μ L – 5000 μ L.
- Preparación de los patrones de ácidos grasos volátiles: las disoluciones madre de cada uno de los ácidos (acético, propanoico, butírico y hexanoico) se prepararon disolviendo 250,00 μ L de cada patrón en 25,00 mL de éter etílico, el Cuadro IV, resume la concentración de las disoluciones madre.

Cuadro IV. Concentración de las disoluciones madre de cada uno de los AGV a partir de las cuales se prepararon los patrones de las curvas de calibración.

Ácido	Alicuota ($\pm 3 \mu$ L)	Volumen final (± 0.02 mL)	Concentración mg/L
Acético	250	25,00	$(1,05 \pm 0,03) \cdot 10^4$
Propanoico	250	25,00	$(9,9 \pm 0,2) \cdot 10^3$
Butírico	250	25,00	$(9,6 \pm 0,2) \cdot 10^3$
Hexanoico	250	25,00	$(9,3 \pm 0,2) \cdot 10^3$

El Cuadro V resume la preparación de los diferentes patrones utilizados en las curvas de calibración para la cuantificación de AGV.

Cuadro V. Preparación de los patrones de AGV y estándar interno para la preparación de las curvas de calibración.

Número de patrón	Alicuota de disolución madre (μL)	Volumen final ($\pm 0.02 \text{ mL}$)	Concentración (mg/L)			Ácido hexanoico (mg/L)
			Ácido acético	Ácido propanoico	Ácido butírico	
1	100 \pm 2	10,00	105 \pm 3	99 \pm 3	96 \pm 3	(4,7 \pm 0,1) $\cdot 10^2$
2	200 \pm 4		210 \pm 7	199 \pm 6	192 \pm 6	
3	300 \pm 6		(3,2 \pm 0,1) $\cdot 10^2$	298 \pm 9	287 \pm 9	
4	400 \pm 8		(4,2 \pm 0,1) $\cdot 10^2$	(4,0 \pm 0,1) $\cdot 10^2$	(3,8 \pm 0,1) $\cdot 10^2$	
5	500 \pm 10		(5,3 \pm 0,2) $\cdot 10^2$	(5,0 \pm 0,1) $\cdot 10^2$	(4,8 \pm 0,1) $\cdot 10^2$	
6	1000 \pm 6		(1,04 \pm 0,03) $\cdot 10^3$	(1,00 \pm 0,02) $\cdot 10^3$	(9,6 \pm 0,2) $\cdot 10^2$	
7	2000 \pm 9		(2,10 \pm 0,05) $\cdot 10^3$	(2,00 \pm 0,05) $\cdot 10^3$	(1,92 \pm 0,05) $\cdot 10^3$	
8	3000 \pm 16		(3,15 \pm 0,08) $\cdot 10^3$	(3,00 \pm 0,07) $\cdot 10^3$	(2,90 \pm 0,07) $\cdot 10^3$	
9	4000 \pm 22		(4,2 \pm 0,1) $\cdot 10^3$	(4,0 \pm 0,1) $\cdot 10^3$	(3,8 \pm 0,1) $\cdot 10^3$	
10	6 000 \pm 32		(6,3 \pm 0,1) $\cdot 10^3$	(6,0 \pm 0,1) $\cdot 10^3$	(5,7 \pm 0,1) $\cdot 10^3$	
11	8 000 \pm 43		(8,4 \pm 0,2) $\cdot 10^3$	(8,0 \pm 0,2) $\cdot 10^3$	(8,0 \pm 0,2) $\cdot 10^3$	
12	Disolución madre		(1,0 \pm 0,02) $\cdot 10^4$	(9,9 \pm 0,2) $\cdot 10^3$	(9,6 \pm 0,2) $\cdot 10^3$	(4,7 \pm 0,1) $\cdot 10^2$

2.4. Metodología

A. Muestreo y almacenamiento de las muestras

- *Muestras de biogás:* se tomaron semanalmente a partir de la cuarta semana de funcionamiento de los biodigestores, y durante las 12 semanas posteriores. Los días de muestreo, se conectó una bolsa de muestreo a una bomba y esta se conectó al biodigestor respectivo. Antes de obtener la muestra, se purgó la bolsa solo una vez con el gas a muestrear, porque el volumen de gas era poco para hacer varias purgas. Entre cada muestra, se purgo la bomba con aire, para evitar contaminación entre muestras.
- *Muestras de ácidos grasos volátiles:* antes de tomar las muestras se agitó el contenido de los biodigestores y se llenaron tubos de microcentrífuga (marca eppendorf de 2 mL); la toma de las muestras se llevó a cabo dentro de una atmósfera inerte de nitrógeno. Las muestras se almacenaron en un refrigerador a 4 °C hasta el día en que se trataron para el análisis.

B. Análisis de las muestras:

- *Determinación de la composición de biogás:* debido al diseño de las bolsas de muestreo, la toma de la muestra a inyectar se realizó abriendo la válvula de la bolsa respectiva, se introdujo la jeringa y succionó el gas. Antes de inyectar las muestras en el cromatógrafo, la jeringa se purgó 3 veces con una porción del contenido de la muestra. El volumen inyectado fue de 100 µL. Las muestras se analizaron el mismo día que se tomaron.

Debido a que el hidrógeno posee una conductividad térmica de 168,35 mW/mK y el helio de 142,64 mW/mK, el hidrógeno no fue detectable al utilizar helio como gas portador, por la cercanía de la señal del hidrogeno con la línea base. Fue preciso utilizar nitrógeno, cuya conductividad es de 24,0 mW/mK, y la sensibilidad al utilizar nitrógeno, es diferenciada entre analitos, se obtuvo una mayor sensibilidad para el metano; por lo que se utilizó un factor de respuesta, para corregir los datos.

Para obtener el factor de respuesta, se midió el patrón certificado de gases dos veces, en días diferentes, con helio y nitrógeno como gases de arrastre. El factor de respuesta se multiplicó por el área de cada analito y los porcentajes se obtuvieron a partir de las áreas corregidas.

▪ *Extracción y cuantificación de los ácidos grasos volátiles:* las muestras se trasvasaron a tubos de ensayo de vidrio de 100 mm · 10 mm; luego se les adicionó cloruro de sodio hasta saturarlas, y ácido clorhídrico al 1 % en volumen, con agitación constante hasta que el pH de las muestras estuviera entre 3 y 4, esto se confirmó utilizando tiras de papel de pH. Luego se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se filtró a través de algodón; del filtrado se tomaron dos alícuotas de 300 µL, se colocaron en tubos de microcentrifuga de 2 mL. Para la extracción se les agregó 300 µL de éter etílico, y se agitaron manualmente durante un minuto; se separó la fase etérea y se colocó en viales de vidrio de 2 mL. Este procedimiento se realizó dos veces para cada réplica. Una vez mezcladas las dos fracciones etéreas, se calentaron levemente a 45 °C en una plantilla para calentamiento hasta sequedad.

Una vez que los viales alcanzaron la temperatura ambiente, se les agregó 125 µL de éter etílico y 125 µL de patrón de ácido hexanoico preparado en éter etílico de concentración 465 mg/L. La Figura 9, resume el procedimiento de tratamiento de las muestras previo a la inyección en el cromatógrafo. Las alícuotas de éter etílico y disoluciones preparadas con ese disolvente, se midieron a temperatura de un baño hielo y agua (0 °C), pues la baja viscosidad del éter etílico dificulta su manipulación a temperatura ambiente.

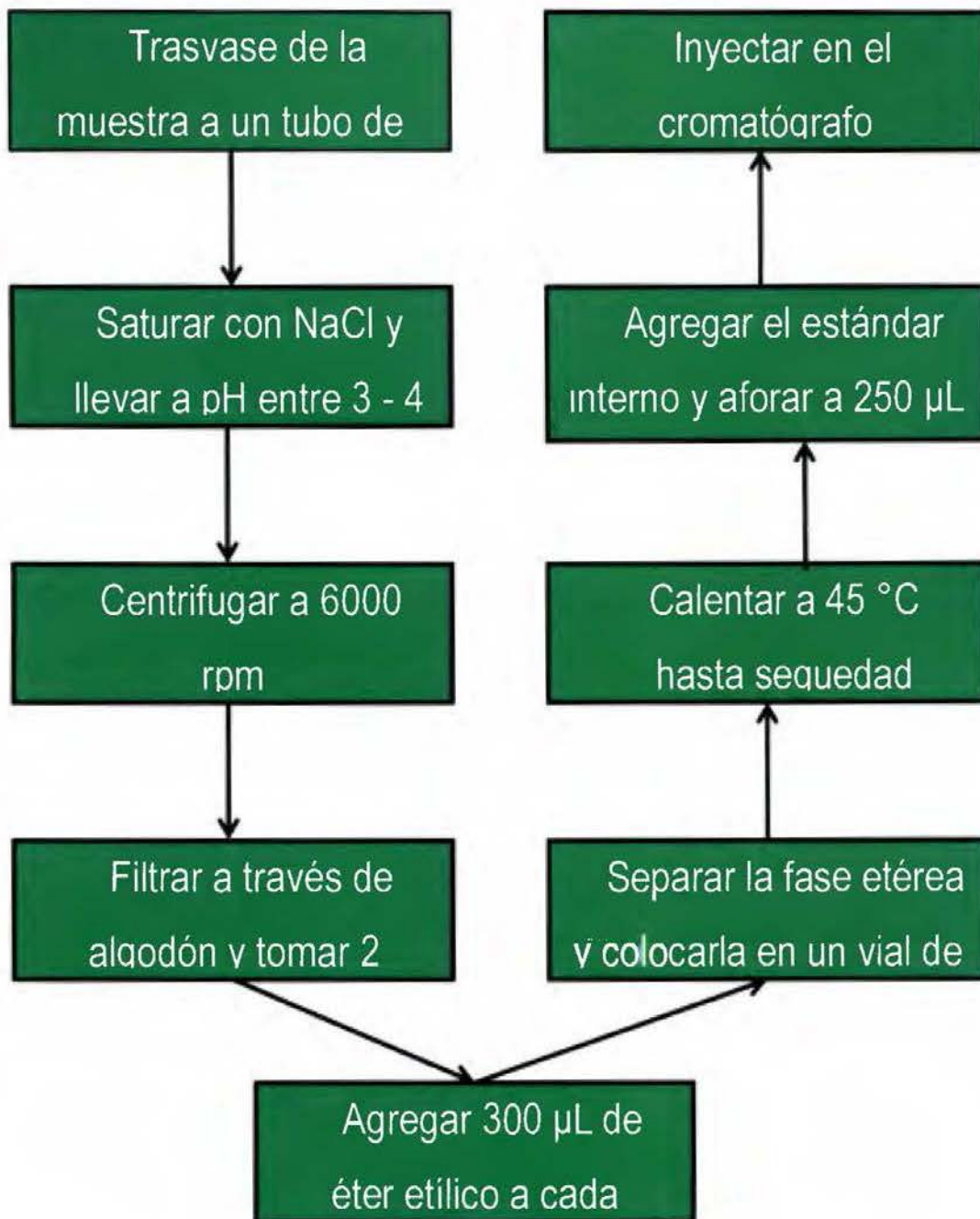


Figura 9. Tratamiento previo a la inyección en el cromatógrafo de las muestras de los lodos de los biodigestores para determinar ácidos grasos volátiles.

C. Condiciones de operación de los equipos cromatográficos:

El Cuadro VI, resume las condiciones de operación de los cromatógrafos para la determinación de la composición de biogás y la concentración de ácidos grasos volátiles.

Cuadro VI. Condiciones de operación del cromatógrafo para la determinación de la composición de biogás y para la cuantificación de ácidos grasos volátiles.

Método biogás		Método ácidos grasos volátiles	
Condición	Valor	Condición	Valor
Rampa de temperatura del horno	100 °C 4 min 15 °C/min hasta 200 °C	Temperatura del horno (°C)	200
Temperatura del inyector (°C)	200	Temperatura del detector e inyector (°C)	280
Temperatura del detector (°C)	230	Presión del hidrógeno (kPa)	100
Flujo de N ₂ (mL/min)	4,0	Presión del aire (kPa)	35
Presión N ₂ (k Pa)	20	Presión del nitrógeno (kPa)	100
		Presión del gas auxiliar (kPa)	100

2.5. Validación de los métodos cromatográficos

A. Determinación de la composición de biogás: se utilizó como referencia el método utilizado por Buitron y Carvajal (2010), con la diferencia que se trabajó con una rampa de temperatura y no a temperatura constante.⁶⁰

- Optimización de la columna: se calentó durante aproximadamente 12 h distribuidas en cuatro días, a 200°C, hasta que la línea base no presentó fluctuaciones.
- Precisión: se evaluó la repetibilidad del método y de la inyección y del método, durante los días 21, 38, 52, 73, 80, 95 y 102 de operación de los biodigestores, se inyectó una muestra 7 veces. El patrón de gas de refinería, se inyectó siete veces en dos días de análisis diferentes. Con los valores obtenidos se calculó el coeficiente de variación, cuyo valor debió ser menor o igual al 10 %, para

considerarse aceptable, y el intervalo de confianza como $\pm t \cdot s / \sqrt{n}$. No se evaluó ni la reproducibilidad, ni la precisión intermedia, pues no fue posible utilizar otro analista o cromatografía, y una misma muestra.³⁷

- Exactitud: se inyectó el patrón de gases de refinería, dos días diferentes, siete veces cada día, durante la semana 3 y semana 5. Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre, con esto se calculó el porcentaje de error aplicando la ecuación (1). El error, es una medida de sesgo, es decir permite evaluar los errores sistemáticos del método. El valor debió ser menor al 3 % para considerarse aceptable.⁶¹

$$\% \text{ error} = \left(\frac{\text{valor obtenido} - \text{valor reportado}}{\text{valor reportado}} \right) \cdot 100\% \quad (1)$$

- Efecto del flujo de gas sobre los resultados: se probó cinco inyecciones de una muestra a cuatro flujos de gas de arrastre: 3,0 mL/min, 3,5 mL/min, 4,2 mL/min y 4,5 mL/min; los resultados de porcentaje de metano y dióxido de carbono se compararon con los obtenidos con el flujo de 4,0 mL/min. Para determinar si existía diferencia significativa se calculó la t de student por parejas y un ANOVA de un factor.

B. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles:

- Enriquecimientos: permiten evaluar la veracidad del método, se realizaron enriquecimientos con los ácidos carboxílicos a un nivel de concentración de 300 mg/L hasta 350 mg/L; por cuadruplicado. Para ello se tomaron ocho alícuotas de muestra, cuatro de las réplicas se enriquecieron con una alícuota de patrón de cada ácido preparado en agua destilada, a los otros cuatro se les agregó la misma alícuota, pero de agua destilada; luego se realizó la extracción y cuantificación según el procedimiento establecido.

Para calcular el porcentaje de recuperación, se utilizó la ecuación 2:

$$\left(\frac{\text{mg de ácido cuantificados}}{\text{mg de ácido agregados}} \right) \cdot 100\% \quad (2)$$

- Linealidad: se prepararon tres curvas de calibración según las concentraciones mostradas en el Cuadro V, cada patrón fue preparado en éter con la concentración indicada para cada ácido, además de ácido hexanoico como estándar interno.

- **Cuadro VII.** Curvas de calibración que se prepararon para verificar el rango y la linealidad de cuantificación de AGV.

-

Rango de concentraciones (mg/L)	Número de patrones
200 – 500	5
100 – 4000	9
3000 – 10000	5

Cada patrón se inyectó por duplicado en una sola sesión de trabajo, se obtuvo un promedio de los valores y se construyeron los gráficos de las curvas de calibración respectivas. Se determinó el coeficiente de correlación de los datos, el valor de este debió ser al menos de 0,90 para considerar que la relación es lineal, además se calculó el valor de t de student, para evaluar la significancia del coeficiente de correlación, es decir si existe correlación entre los datos, según la ecuación (3).⁵⁸

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (3)$$

- Precisión: se evaluó como repetibilidad, se inyectaron siete veces los patrones de concentraciones 200 mg/L y de 1000 mg/L, y una muestra, en una sesión de trabajo, con esos resultados se calculó el ámbito de confianza con un α de 0,05 $\left(\pm t \cdot s / \sqrt{n}\right)$ para cada ácido y el coeficiente de variación, cuyo valor debió ser igual o menor a 10 %⁶².

Además se calculó la repetibilidad total del método, para esto se prepararon siete réplicas de patrones a dos niveles de concentración, uno de 600 mg/L y el otro de 3000 mg/L, y siete réplicas independientes de una muestra, y se midieron en una sola sesión de laboratorio.^{58,62}

- Límite de detección (LD) y cuantificación (LC): se calcularon como la desviación estándar del blanco dividida entre la pendiente; este factor multiplicado por tres en el cálculo del LD de detección y por diez en el de LC, como muestran las ecuaciones 4 y 5. ^{58,62}

$$LD = \frac{3 \cdot sd_{y/x}}{m} \quad (4)$$

$$LC = \frac{10 \cdot sd_{y/x}}{m} \quad (5)$$

Donde m es la pendiente de la recta de mejor ajuste, $sd_{y/x}$ es la desviación estándar de la ordenada en el origen.

- Evaluación del efecto de la temperatura del inyector, horno y detector: se comparó los resultados obtenidos a las condiciones de operación del método, es decir el inyector y detector a 280 °C y la del horno a 200 °C, con los obtenidos al modificar la combinación de temperaturas de operación; para 5 patrones con concentraciones de 6000 mg/L de cada ácido. El Cuadro VIII , resume las condiciones comparadas.

Cuadro VIII. Temperaturas del horno y del inyector-detector utilizadas para evaluar la robustez del método de cuantificación de ácidos grasos volátiles.

Condición	Temperatura del horno (°C)	Temperatura del detector e inyector (°C)
1	150	200
2	150	280
3	170	280

3. Resultados y discusión de la validación de los métodos cromatográficos

El presente capítulo, describe los resultados obtenidos de la validación de los métodos cromatográficos para la determinación de la composición de biogás y ácidos grasos volátiles.

3.1 Composición del biogás:

A. *Optimización de la columna cromatográfica:* después del acondicionamiento de la columna, se optimizaron las condiciones de operación, hasta obtener buena resolución de los picos cromatográficos y una línea base constante. La Figura 10 muestra un cromatograma obtenido durante la optimización de la columna y del método y otro cromatograma, y la Figura 11 uno obtenido una vez estabilizadas las condiciones de operación.

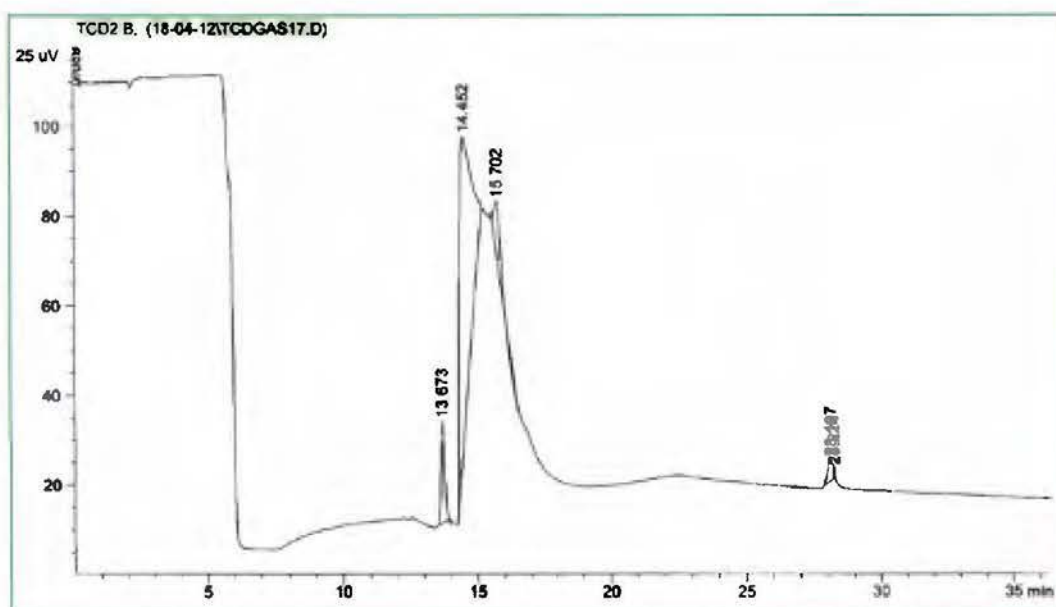


Figura 10. Cromatograma obtenido durante la optimización del método para la determinación de la composición de biogás a 100 °C, modo isotérmico.

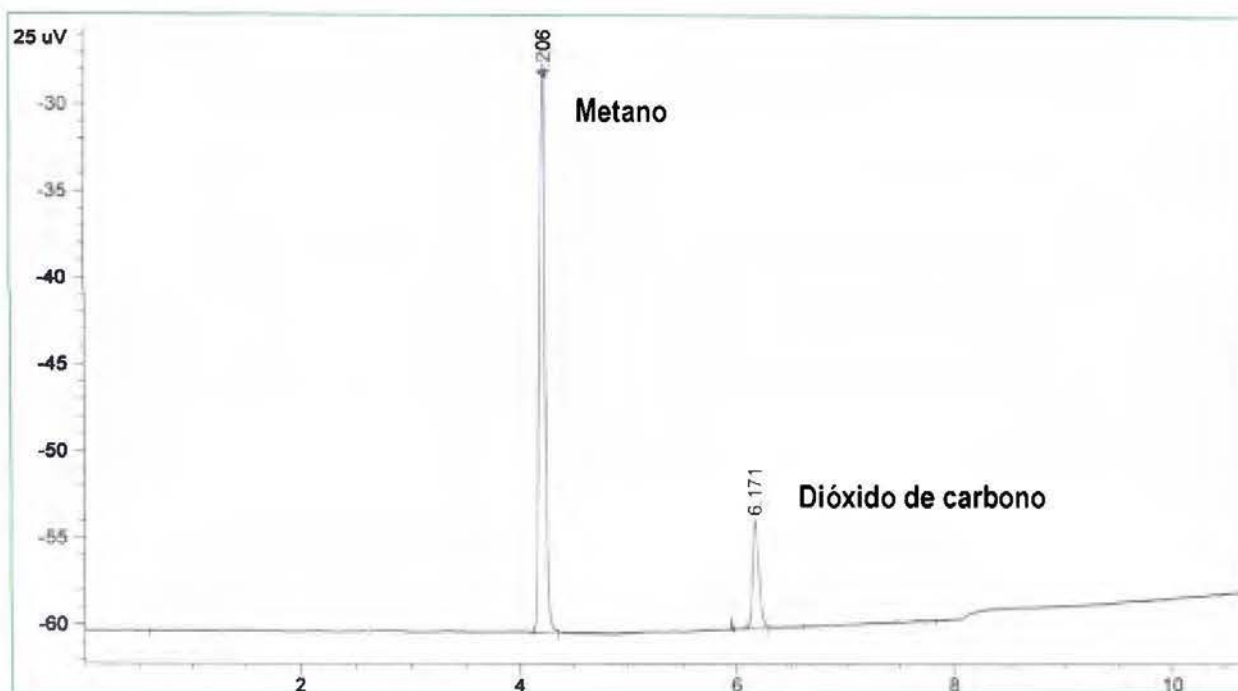


Figura 11. Cromatograma obtenido después de la optimización de las condiciones de operación, rampa 100 °C durante 4 minutos 15 °C/min hasta 200 °C, inyector a 200°C y detector a 230°C

B. Determinación del factor de respuesta: el Cuadro IX, resume los resultados de factor de respuesta; obtenidos con el fin de corregir las áreas de los cromatogramas.⁶³

Cuadro IX. Factores de respuesta obtenidos para los gases analizados por el método para la determinación de biogás.

Gas	Factor de respuesta	Conductividad (W / mK) ⁶⁴
Dióxido de carbono	0,541	14,65
Metano	0,083	32,81
Hidrógeno	0,037	168,35

Los valores del factor de respuesta siguen la tendencia de que a mayor valor del factor de respuesta, menor es la sensibilidad del gas cuando es analizado con nitrógeno como gas de arrastre. El hidrógeno es el gas que tiene mayor sensibilidad, seguido por el metano y por último el dióxido de carbono, lo cual es consistente con los valores de conductividad de los gases.⁶⁴

Los resultados reportados para los biodigestores fueron corregidos con el factor de respuesta, pues, por recomendación de la profesora Paulina Silva Trejos, después de una entrevista con ella, estuvo de acuerdo con la corrección debido al bajo porcentaje de recuperación, con el fin de aproximar los resultados al valor verdadero.⁸¹

C. Figuras de mérito: la siguiente sección, muestra los resultados de la evaluación de las figuras de mérito evaluadas en la validación del método de para la determinación de la composición de biogás.

- **Precisión instrumental:** se determinó como repetibilidad, pues se realizó en períodos de tiempo cortos y para las mismas condiciones de operación.⁶⁵ Se utilizó repetibilidad y no reproducibilidad, debido a la dificultad para obtener muestras similares en un mismo día. Se utilizó el promedio y las desviaciones estándar asociadas a las señales analíticas de las áreas corregidas con el factor de respuesta respectivo.

El Cuadro X, muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión. Se calculó el coeficiente de variación y el intervalo de confianza, que son medidas de dispersión, y representan una variabilidad relativa entre la desviación de las mediciones y el valor promedio. El intervalo de confianza, se calculó con un t de 2,45, para 6 grados de libertad con un intervalo de confianza del 95 %.⁵⁸

Cuadro X. Valores de coeficiente de variación e intervalo de confianza obtenido para la determinación de la composición de biogás durante el funcionamiento de los biodigestores.

Día del experimento	Dióxido de carbono		Metano	
	% CV	$\frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$	% CV	$\frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$
21	2,9	0,3	1,2	0,7
38	1,7	0,1	0,3	0,2
52	2,8	0,2	1,3	0,8
73	0,5	0,1	0,1	0,1
80	1,0	0,1	0,2	0,1
95	0,8	0,1	0,1	0,1
102	0,9	0,1	0,1	0,1
Valores promedio	0,9	2,4	0,6	0,2

En el estudio realizado por Marín *et al.*, (2007), se cuantificó la producción de metano e hidrógeno en biodigestores anaerobios, por cromatografía de gases y reportó coeficientes de variación menores al 5 % para el método que utilizó, esto concuerda con los resultados obtenidos para la validación, pues los coeficientes de variación se encuentran entre 0,1 % y 2,9 %.⁶⁶

▪ Exactitud: manifiesta la cercanía entre los resultados obtenidos, y un valor considerado como verdadero.⁵⁸ En este caso se utilizó el valor reportado para el patrón de gas de refinería lote 112PLU1SPC10D. El Cuadro XI, muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la exactitud.

Se calculó el valor de t de comparación de medias, para cuatro grados de libertad, para una prueba de dos colas a un intervalo de confianza de 95 %; el coeficiente de variación y el porcentaje de error para los resultados obtenidos.

Cuadro XI. Resultados de la medición del patrón de gas de refinería lote: 112PLU1SPC10D, con el método para la determinación de la composición de biogás.

Gas	Concentración promedio (%)	% CV	T experimental	% reportados por el fabricante	T crítico $\alpha=0,05$
Hidrógeno	15,2	3,0	1,19	15,0	
Metano	5,0	3,8	0,79	5,0	
Dióxido de carbono	4,9	5,1	1,46	5,0	2,78

Los resultados se consideran aceptables para todos los gases, pues los valores de porcentaje de error son menores al 5 %, al igual que lo observado por Marín *et al* (2007), para muestras similares por cromatografía de gases con TCD como detector. ⁶⁶ Según los valores de t obtenidos el porcentaje de cada gas, no difiere significativamente del valor reportado por el fabricante, para los tres gases.

- Evaluación del flujo del gas de arrastre en la determinación de la proporción del biogás: para evaluar este parámetro, se compararon los resultados obtenidos para una misma muestra en condiciones normales de flujo de gas de arrastre, es decir a 4 mL/min y a dos flujos por encima y por debajo del valor utilizado en la medición de las muestras.

Se calculó el valor de t_{exp} para la prueba de comparación de medias y se aplicó la prueba F para determinar la equivalencia entre las desviaciones estándar. El Cuadro XII, resume los resultados obtenidos para los flujos que se compararon.

Cuadro XII. Valor de *t* student de contraste de datos emparejados y *F* para diferentes flujos de gas para el método de determinación de la proporción de biogás.

Flujo de gas de arrastre mL/min	Valor de <i>t</i> de Student con $\alpha= 0,05$ para el % de CH ₄ y % CO ₂	Valor de F _{5,5} $\alpha= 0,05$ obtenido de ANOVA
3,0	0,99	1,30
3,5	0,55	0,11
4,2	4,11	25,9
4,5	3,53	13,5

Los resultados obtenidos para flujos de 3,0 mL/min y 3,5 mL/min, se pueden considerar iguales a los obtenidos con el flujo de 4,0 mL/min; pues el valor de *t de student* obtenido es menor que el valor crítico de 2,78, para cuatro grados de libertad y un intervalo de confianza del 95 %; y el valor de F_{5,5} obtenido en esos casos es menor al valor crítico de 7,39 para cinco grados de libertad, y una *F* de dos colas.

Para los flujos de 4,2 mL/min y 4,5 mL/min las diferencias si son significativas pues los resultados obtenidos para la *t de student* y la F_{5,5} son mayores a los valores críticos de 2,78 y 7,39, respectivamente.

Los resultados del Cuadro XII, demuestran que el método es robusto para flujos de gas de arrastre desde 3,0 mL/min hasta 4,0 mL; mientras que para flujos superiores a 4,0 mL/min, los resultados son significativamente diferentes.

3.2 Concentración de ácidos grasos volátiles:

A. Optimización de la columna cromatográfica:

Para la determinación de AGV, no fue necesario optimizar la columna, se adoptaron las condiciones recomendadas por ficha técnica de Agilent de Zhao, S. 2013. La Figura 12, es un cromatograma obtenido durante el desarrollo del método.⁷⁸

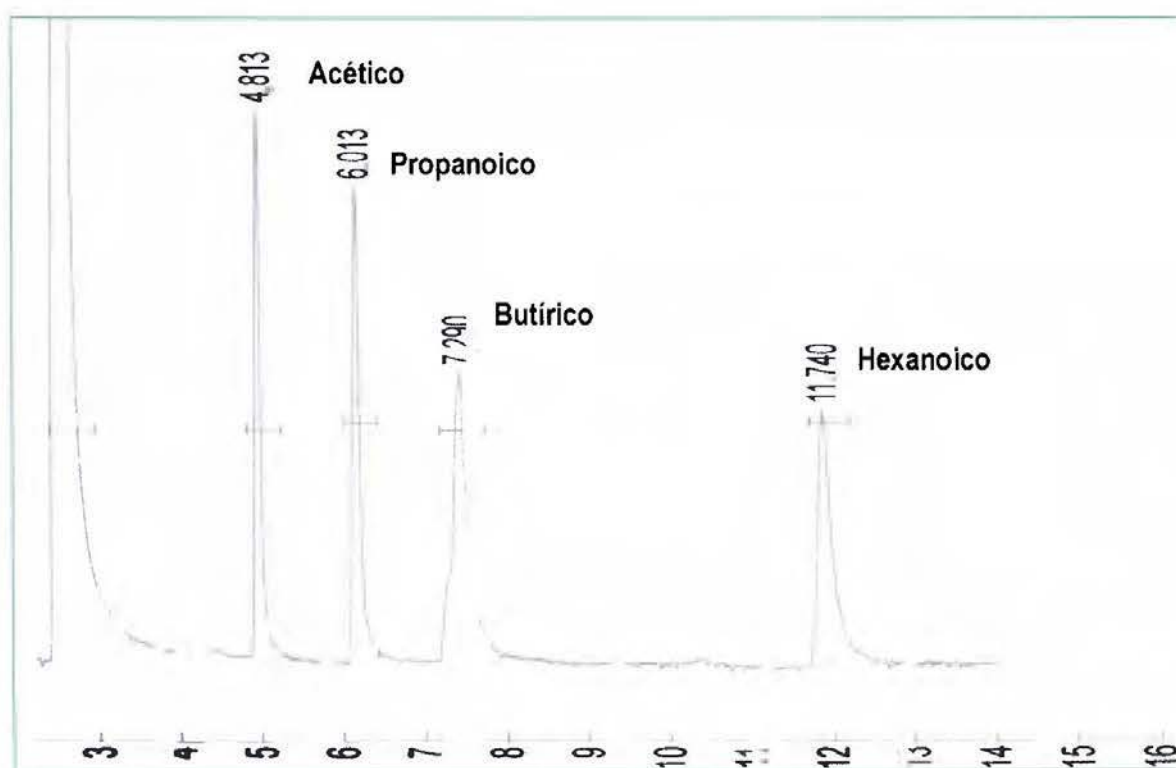


Figura 12. Cromatograma de un patrón de AGV obtenido después de la optimización del método, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa.

B. Figuras de mérito:

▪ Porcentaje de recuperación: se realizaron pruebas de recuperación, con el fin de determinar qué porcentaje de los ácidos grasos volátiles se extrajeron de la matriz después de la extracción con éter etílico, y verificar si los valores obtenidos eran aceptables. Se calculó el porcentaje de recuperación con la ecuación 2. Los resultados permiten evaluar la exactitud del método de extracción de ácidos grasos volátiles.

El Cuadro XIII, muestra los resultados de porcentaje de recuperación de los ácidos grasos volátiles, para seis réplicas, medidas por duplicado. Los valores de porcentaje de recuperación se utilizaron para corregir los datos de las muestras obtenidos a lo largo del experimento.

Cuadro XIII. Porcentajes de recuperación obtenidos para los AGV, después de ser extraídos con éter etílico.

Ácido	% de recuperación
Acético	58 - 63
Propanoico	70 - 75
Butírico	84 - 95

Toledano *et al* (2003), reportan porcentajes de recuperación promedio de 101 % para muestras acuosas, que se midieron de forma directa después de ser filtradas, que no es el caso del método aplicado pues este implica extracción y pretratamiento de la muestra.

Los resultados, demuestran que la extracción con éter implica una pérdida de analito; además el porcentaje de recuperación, está directamente relacionado con la afinidad de cada uno de los ácidos con el medio acuoso de la matriz, lo que evidencia que el pretratamiento causa pérdidas de analito, especialmente considerando que en la literatura se reportan valores cercanos al 100 % si no se realiza pretratamiento, pero la cantidad sólidos disueltos de las muestras, especialmente sales, lo compromete la integridad de la columna cromatográfica.⁶⁷

▪ Linealidad: para definir el rango de trabajo antes de iniciar el experimento se midieron muestras provenientes de biodigestores similares a los evaluados con un sistema piloto. Se preparó tres curvas de calibración, para cada analito según los rangos mostrados en el Cuadro 14. para cada ácido, el disolvente utilizado fue éter etílico; para la cuantificación se utilizaron las áreas de los analitos, y como estándar interno, ácido hexanoico con una concentración final de (465 ± 13) mg/L.

Se calculó el valor de *t de student*, como prueba de significancia, para verificar que los resultados presentan una correlación lineal.

Cuadro XIV. Valores de *t de student* obtenidos para evaluar la correlación de las curvas de calibración para la cuantificación de ácido acético, propanoico y butírico por cromatografía de gases.

Rangos de concentraciones (mg/L)	Ácidos			Valor de <i>t</i> teórico al 95 % de confianza
	Acético	Propanoico	Butírico	
200-500	4,66	7,68	27,7	4,30
100-4000	8,97	9,08	8,68	2,36
3000-10000	11,11	10,98	8,55	2,31

Debido a que los valores de *t* experimental obtenidos son mayores que la *t* crítica, se considera que la correlación de los datos es lineal, para los tres analitos en los diferentes ámbitos de concentración, ya que en este caso la hipótesis nula es que la correlación entre los datos es nula.⁵⁸

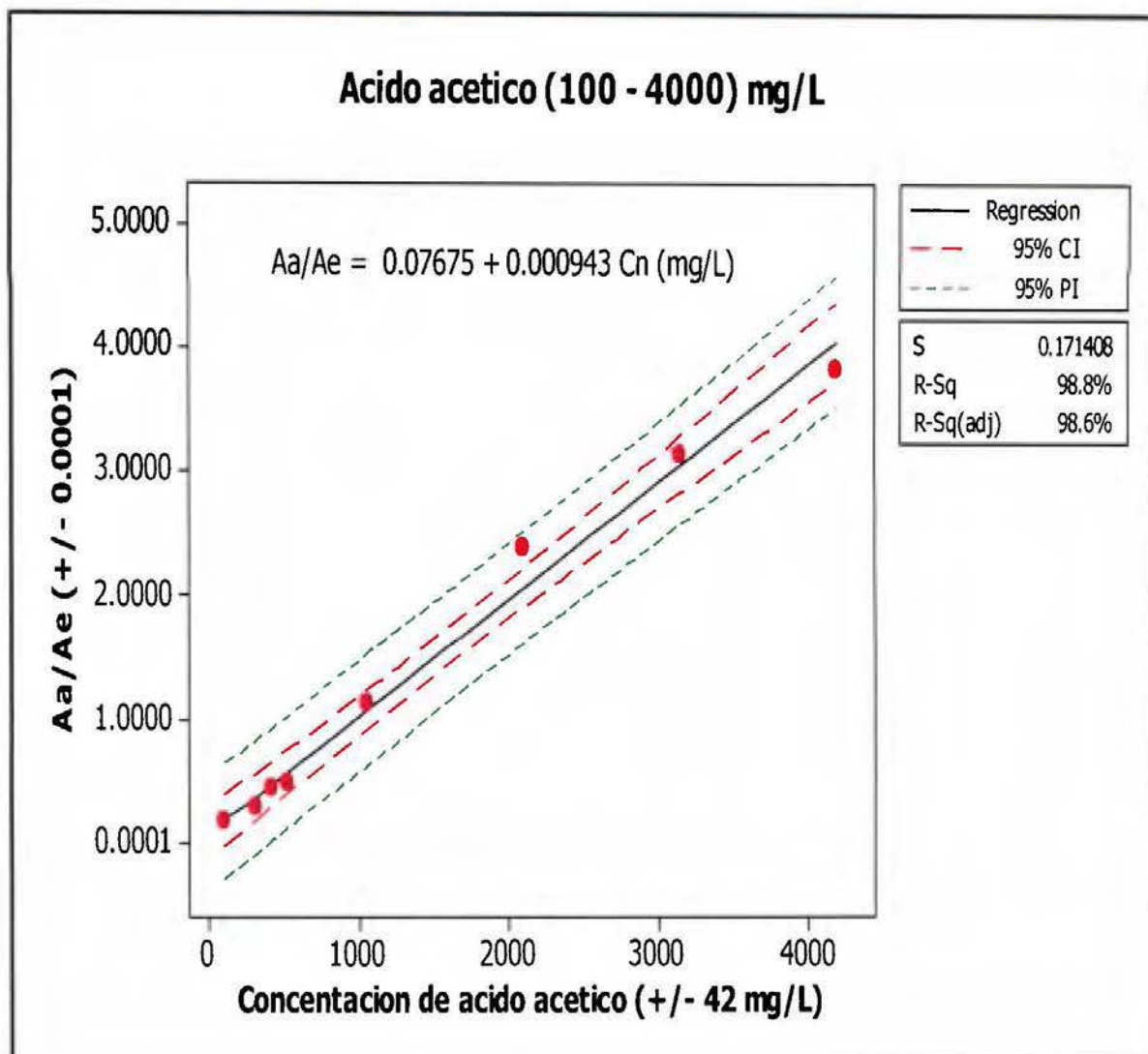


Figura 13. Curva de calibración del ácido acético con un rango de concentración entre 100 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un %CV de 6 %.

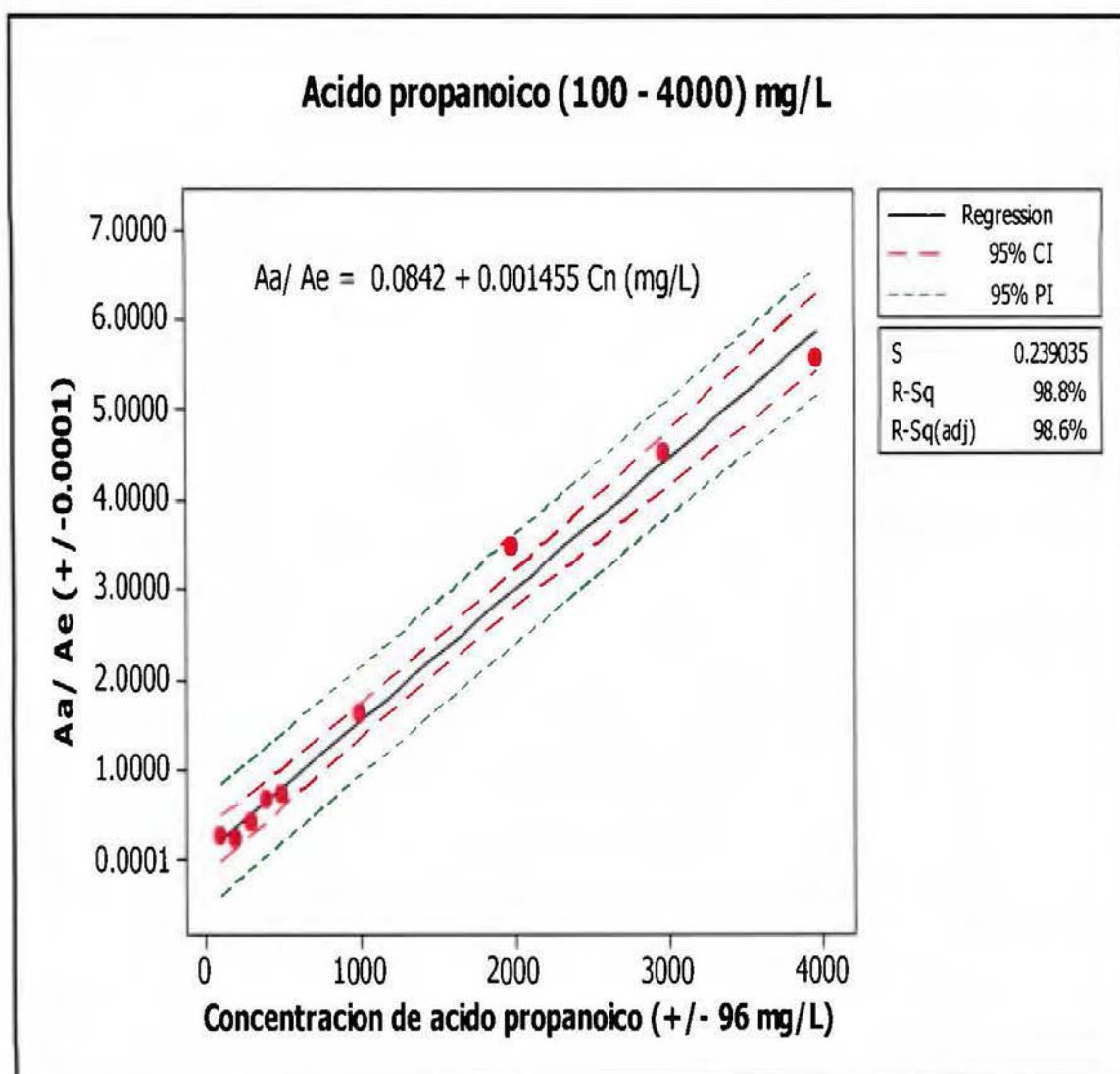


Figura 14. Curva de calibración del ácido propanoico con un rango de concentración entre 100 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 5 %.

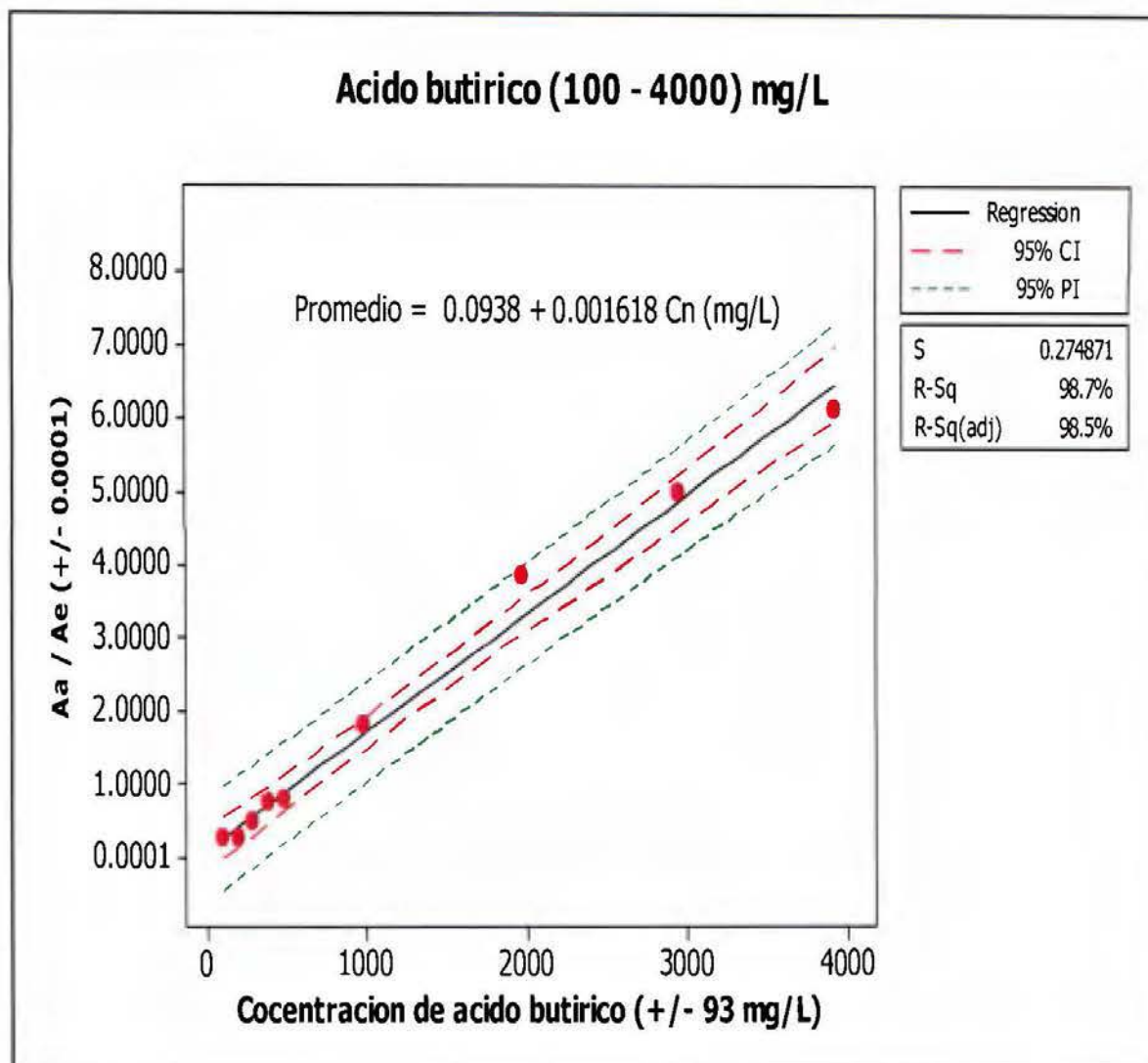


Figura 15. Curva de calibración del ácido butírico con un rango de concentración entre 100 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 10 %.

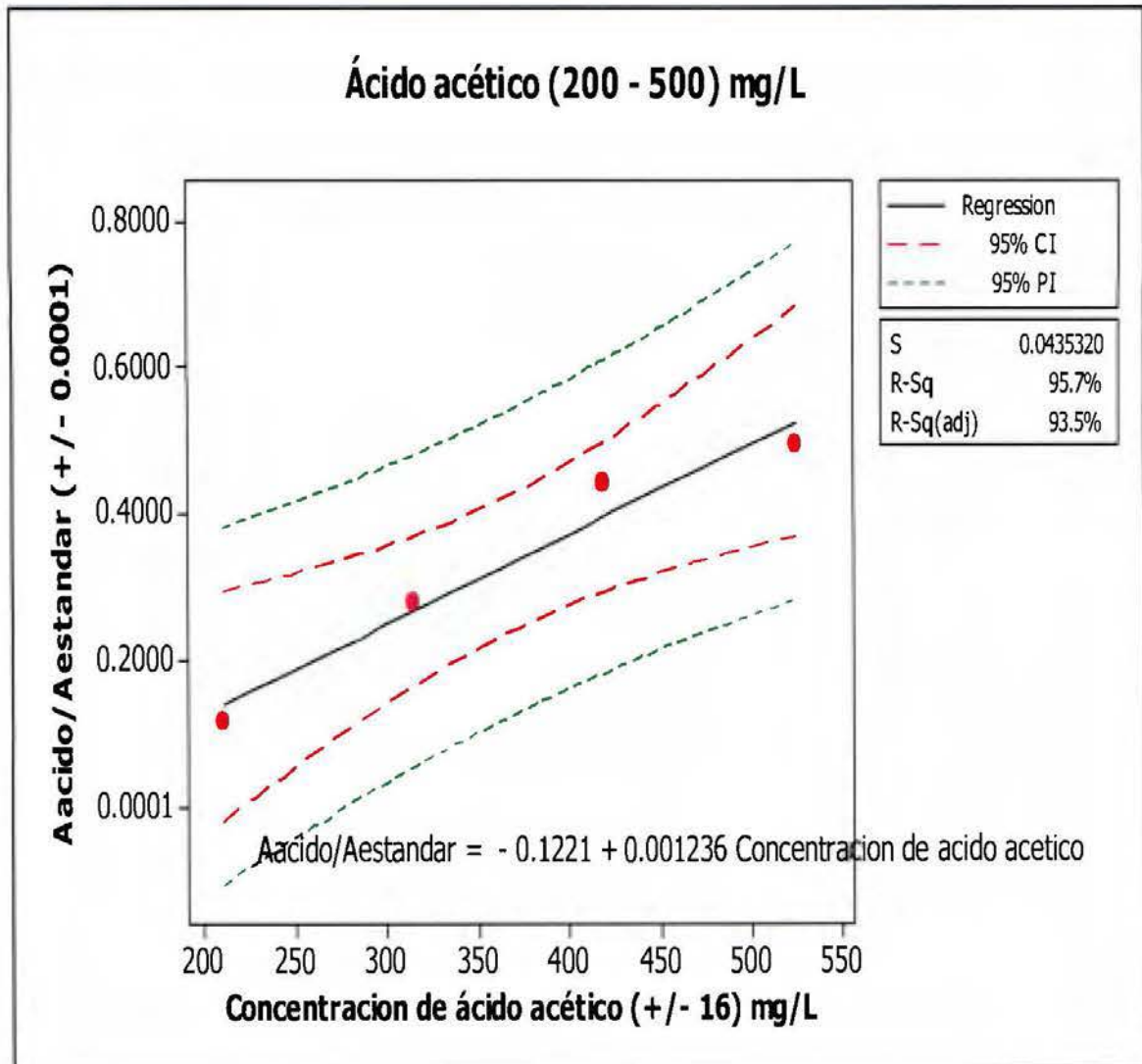


Figura 16. Curva de calibración del ácido acético con un rango de concentración entre 200 mg/L hasta 4000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 6 %.

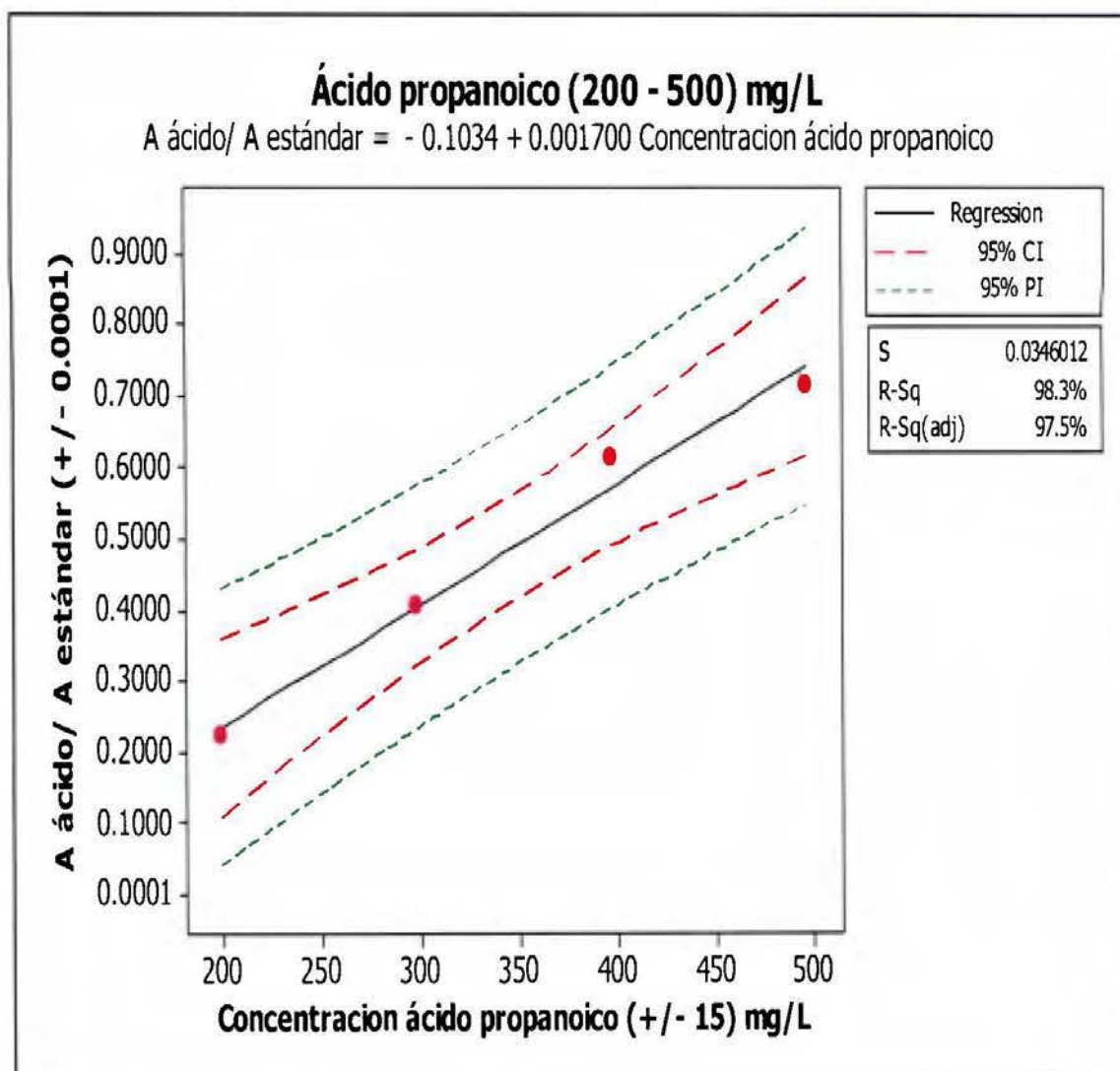


Figura 17. Curva de calibración del ácido propanoico con un rango de concentración entre 200 mg/L hasta 500 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 5 %.

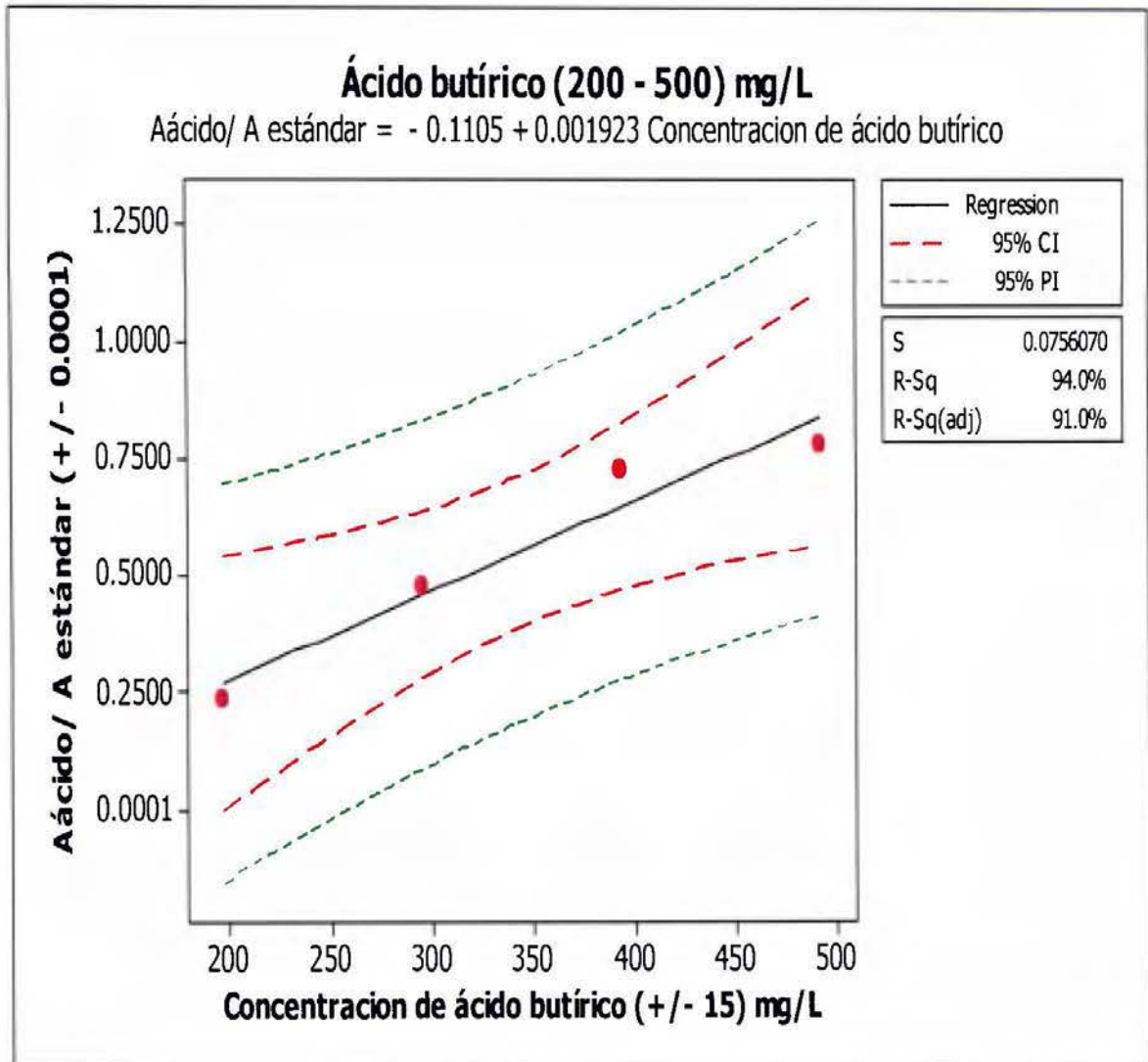


Figura 18. Curva de calibración del ácido butírico con un rango de concentración entre 200 mg/L hasta 500 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 10 %.

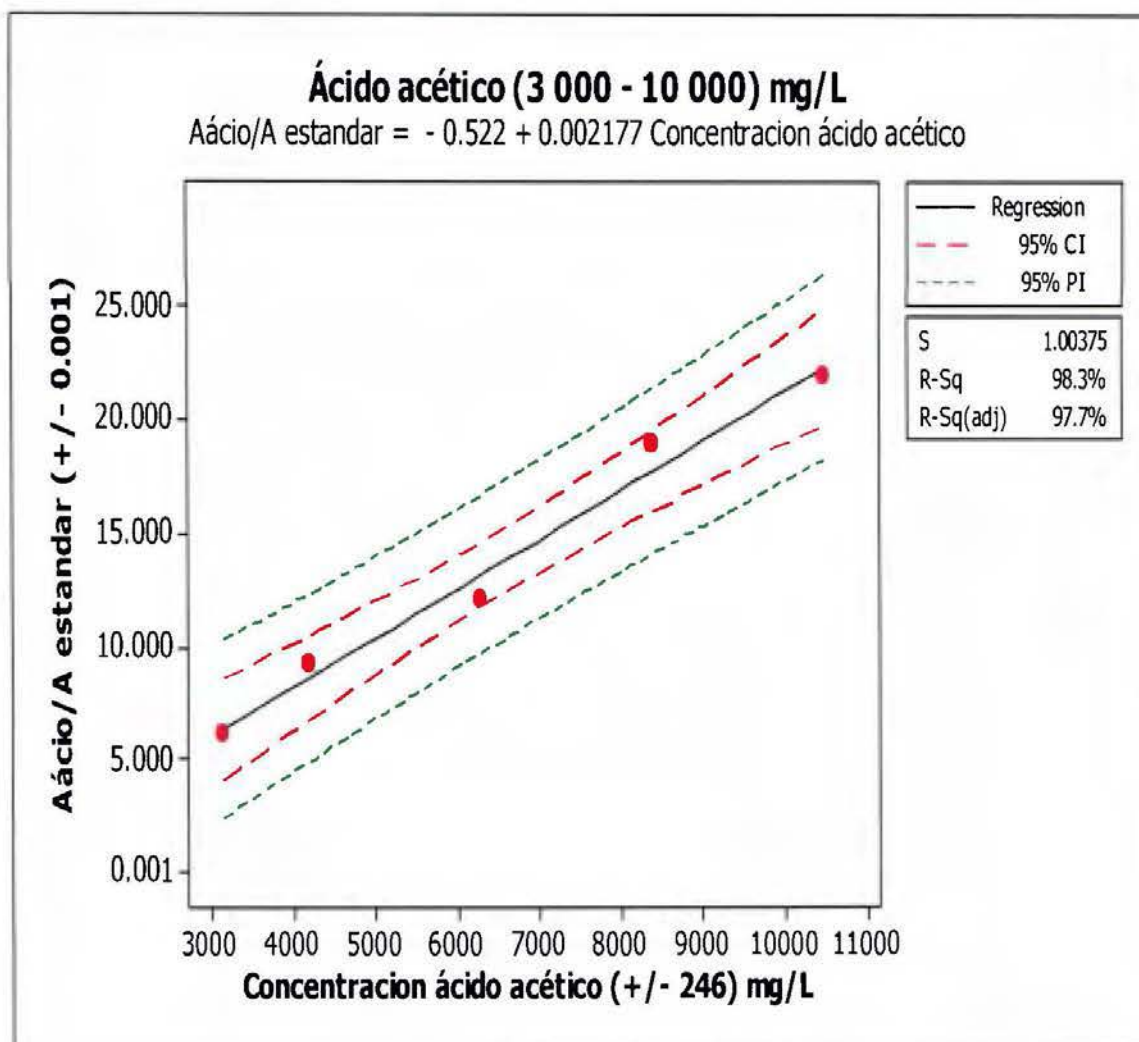


Figura 19. Curva de calibración del ácido acético con un rango de concentración entre 3 000 mg/L hasta 10 000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con % CV de 6 %.

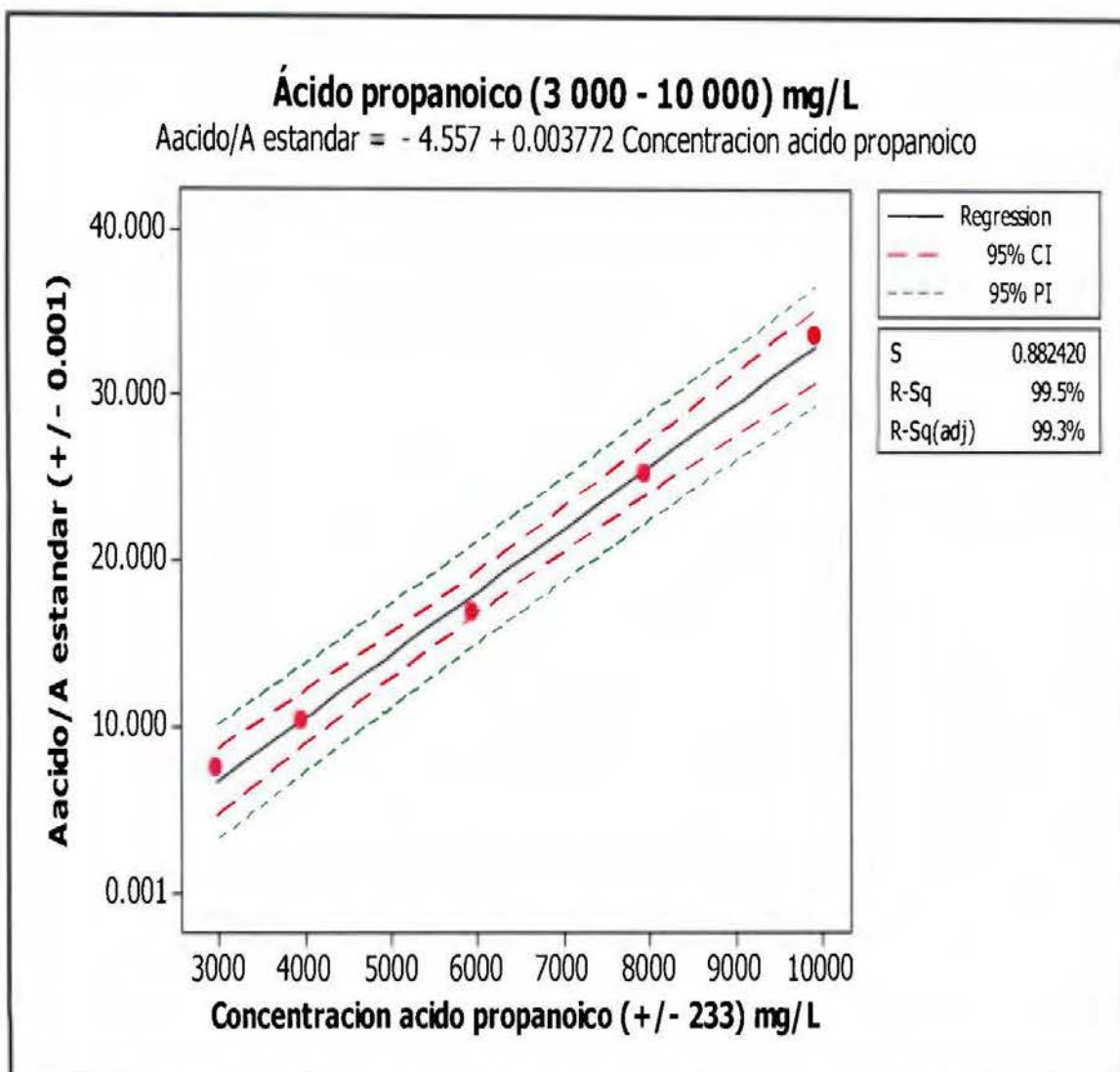


Figura 20. Curva de calibración del ácido propanoico con un rango de concentración entre 3 000 mg/L hasta 10 000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 5 %.

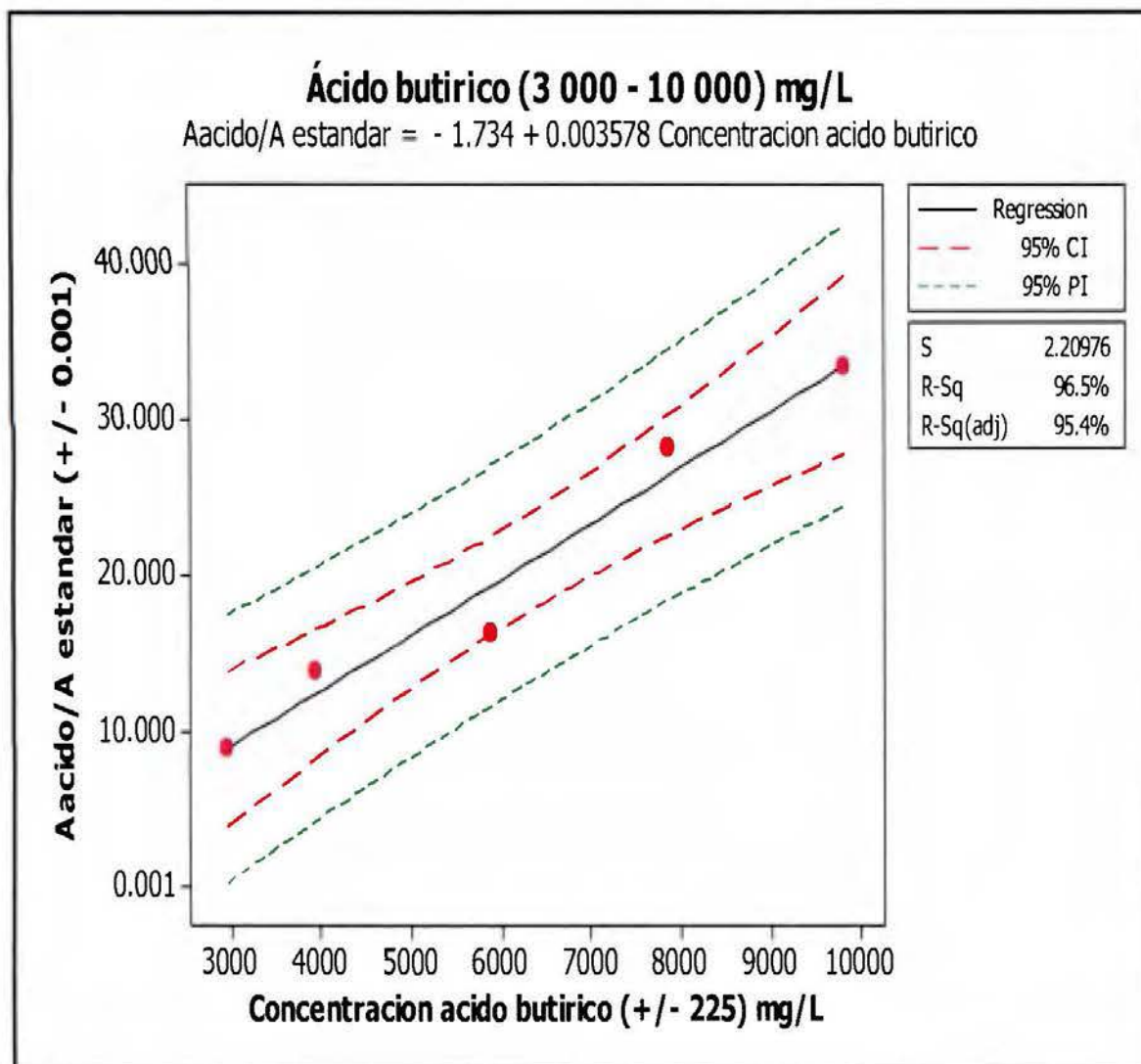


Figura 21. Curva de calibración del ácido butírico con un rango de concentración entre 3 000 mg/L hasta 10 000 mg/L, temperatura de inyector y detector 280 °C, temperatura del horno 200 °C, presión de H₂ 100 kPa, presión de aire 35 kPa y presión de N₂ 100 kPa, con un % CV de 10 %.

▪ **Precisión instrumental:** se determinó como repetibilidad, pues se realizó en períodos de tiempo cortos para las mismas condiciones. Se evaluó la repetibilidad de la inyección, para ello se inyectó siete veces patrones de los AGV con concentraciones de 200 mg/L y 1100 mg/L, del método a dos niveles de concentración, con la medición de siete patrones independientes con concentraciones desde 600 mg/L hasta 3 700 mg/L; y de la extracción para ello se midieron siete réplicas de una muestra que fueron extraídas con éter. Se utilizó el promedio y las desviaciones de los resultados para el análisis estadístico.⁵⁸

El Cuadro XV, muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión. Se utilizó el coeficiente de variación y el intervalo de confianza. El intervalo de confianza, se calculó con un t de 2,45, para 6 grados de libertad con un intervalo de confianza del 95 %.⁵⁸

Cuadro XV. Resultados de % CV e intervalo de confianza de la evaluación de precisión.

Parámetro	Ácidos	Inyección			Método		Extracción
		Patrones (mg/L)		Muestra (mg/L)	Patrón(mg/L)	Patrón(mg/L)	Muestra(mg/L)
		200	1100	700-2600	3200-3700	600-750	660-800
% CV	Acético	2	2	2	6	4	9
	Propanoico	2	2	1	5	1	4
	Butírico	2	2	1	10	1	3
$\frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$	Acético	5	26	35	186	24	58
	Propanoico	5	21	4	156	10	31
	Butírico	11	24	10	340	8	20

El intervalo de confianza oscila entre el 3 % y 10 %, que fue el parámetro de aceptación establecido. En determinaciones similares, Toledano (2003) obtuvo % CV menores al 4 %, en la

determinación de AGV en aguas residuales de la industria cítrica, además Raposo y colaboradores (2013), reportan % CV entre 6 % y 8 %. Se reportan % CV superiores, hasta un 15 %, para métodos que implican pasos de derivatización química, por lo tanto los resultados obtenidos se consideran aceptables. ^{67,68}

- Límite de detección y cuantificación: el límite de detección es la concentración mínima de analito que puede detectarse, pero no se puede cuantificar con las condiciones del método. El límite de cuantificación es la menor concentración que puede ser detectada y cuantificada con una precisión y veracidad aceptables. ⁶⁹

Cuadro XVI. Límites de detección del método para la determinación de AGV según el rango de trabajo, según Miller y Miller, 2002.

Ámbito Concentración (mg/L)	Acético (mg/L)		Propanoico (mg/L)		Butírico (mg/L)	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
200 - 500	56 ± 2	186 ± 6	47 ± 1	158 ± 5	24 ± 1	79 ± 2
100 - 4000	41 ± 1	135 ± 4	32 ± 1	105 ± 3	30 ± 1	99 ± 3
3 000 – 10 000	$(9,7 \pm 0,3) \cdot 10^2$	$(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,1 \pm 0,03) \cdot 10^3$	$(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(3,6 \pm 0,1) \cdot 10^3$

Los límites de detección, son similares a otros reportados en la literatura, Raposo *et al.* (2013), reportaron límites de detección de 5 mg/L, para rangos de trabajo entre 0 mg/L hasta 400 mg/L, 50 mg/L hasta 600 mg/L y 10 mg/L hasta 650 mg/L y límites de cuantificación entre 5 mg/L y 20 mg/L, para curvas entre 50 mg/L hasta 600 mg/L y de 20 mg/L para curvas entre 200 mg/L hasta 8 000 mg/L. Sin embargo, para el método validado, no fue posible obtener límites inferiores, es importante destacar que la sensibilidad del método, y por tanto los valores de los límites de detección y cuantificación, están directamente relacionados con el equipo y por tanto con la sensibilidad del detector.

- Efecto de la temperatura del inyector, detector y horno: el objetivo de este parámetro es determinar el efecto de pequeñas variaciones en las condiciones de operación del método sobre los resultados obtenidos.

Cuadro XVII. Resultados de la evaluación del efecto de la temperatura sobre el método para determinación de AGV.

	Temperatura del horno – Temperatura del detector e inyector (°C)			Valor teórico de F y t	
	Acético	Propanoico	Butírico		
Valor de t de student con $\alpha=0,05$	150 - 200	2,73	2,06	4,47	2,78
	150 - 280	1,05	1,51	1,56	
	170 - 280	5,49	3,57	1,52	
Valor de $F_{5,5}$ $\alpha=0,05$ obtenido de ANOVA	150 - 200	2,57	2,40	16,77	6,26
	150-280	$4,10 \cdot 10^{-4}$	$1,50 \cdot 10^{-3}$	0,0015	
	170 - 280	18,17	8,00	1,23	

Con el estudio del efecto de la temperatura, se confirmó, que para las condiciones de 150 °C - 200°C y 170°C - 280 °C temperatura del horno y del inyector, respectivamente, los resultados son significativamente diferentes a los obtenidos con las condiciones estándar de operación; por lo tanto se concluye que el método no es robusto para la variación de la temperatura de operación que se probaron para el método y que la temperatura debe ser la recomendada en este trabajo.

4. Resultados de la medición de las muestras de los biodigestores

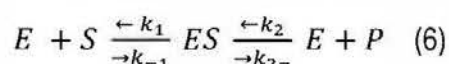
En el presente capítulo, se exponen los resultados de las mediciones de la concentración de ácidos grasos volátiles y la composición del biogás producido, para las seis condiciones de operación de los biodigestores.

La idea de probar varias opciones de composición de sustrato y temperatura fue definir cuál de las condiciones es la mejor para la producción de biogás, especialmente en términos de la temperatura de operación, pues implica un mayor costo.

Se correlacionaron los resultados de composición de biogás con las concentraciones de AGV a través del periodo de operación, y las características químicas de los diferentes sustratos utilizados.

4.1. Concentración de AGV:

La concentración de AGV, es un indicador de la estabilidad del proceso de degradación anaerobia.⁷⁰ Las velocidades de reacción son una combinación de varias reacciones enzimáticas. El modelo Michaelis- Menten, permite explicar el comportamiento de este tipo de procesos, pues simplifica los procesos organizándolos como dos reacciones sucesivas: primero la formación del complejo enzima - sustrato (paso lento), y luego la formación de los productos de reacción, tal como lo muestra la ecuación (6)

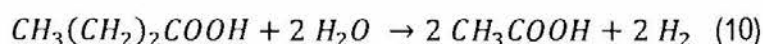
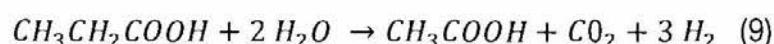
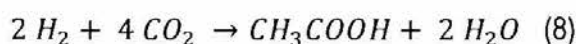


Con el aumento de la concentración de sustrato, la reacción se desplaza hacia la formación de producto, por el principio de Le Chatelier, aumenta también la concentración de la enzima; en este punto la reacción se hace de orden cero respecto a la concentración de sustrato y enzima, la velocidad se vuelve constante; en ese punto se observa que los biodigestores presentan un comportamiento estable, tal como se puede observar con la ecuación (7).

$$V = \frac{k_2 \cdot [E_0] \cdot [S]}{k_m \cdot [S]} \quad (7)$$

Donde E_0 es la concentración total de la enzima, S es la concentración del sustrato, k_2 es la constante de la velocidad de formación del producto y k_m es la constante de Michaelis-Menten.⁸⁰

La Figura 22, muestra la concentración del ácido acético, propanoico y butanoico a través del tiempo de operación de los biodigestores. En el caso de los ácidos propanoico y butanoico, se observan máximos de concentración entre los días 31 y 50, mientras que para el ácido acético, el máximo de concentración, se dio entre los días 51 y 61, lo cual concuerda con el hecho de que los ácidos propanoico y butanoico, reaccionan para formar ión acetato, tal como describen las siguientes ecuaciones químicas.^{79,80}



Estas reacciones no son termodinámicamente favorables, es decir el ΔG° de reacción es positivo; sin embargo, las bacterias optimizan el medio para que se lleven a cabo, pues se alimentan, de los productos formados, por eso en la Figura 22, se ve un crecimiento gradual de la concentración de los ácidos.^{70,79}

Las concentración máxima de ácidos grasos volátiles, la presentó el ácido acético 14 461 mg/L con un coeficiente de variación de 6 %, seguido por el ácido propanoico 13 629 mg/L con un coeficiente de variación de 5 % y por último el ácido butanoico de 8 317 mg/L con un coeficiente de variación de 10 %. Un comportamiento similar reportaron Nuri y Sponza (2007), las concentraciones máximas que obtuvieron oscilaron entre 15 000 mg/L y 23 000 mg /L, en los primeros 30 días de operación de biodigestores alimentados con aguas residuales y desechos municipales.⁷⁰

La etapa acidogénica antecede a la metanogénesis, por lo tanto cualquier factor que afecte o mejore el desempeño de esta etapa condiciona la producción de metano. Por otro lado, a pesar de ser procesos liderados por enzimas, se establece equilibrios de potencial debido a los procesos de reducción-oxidación que ocurren en el medio.

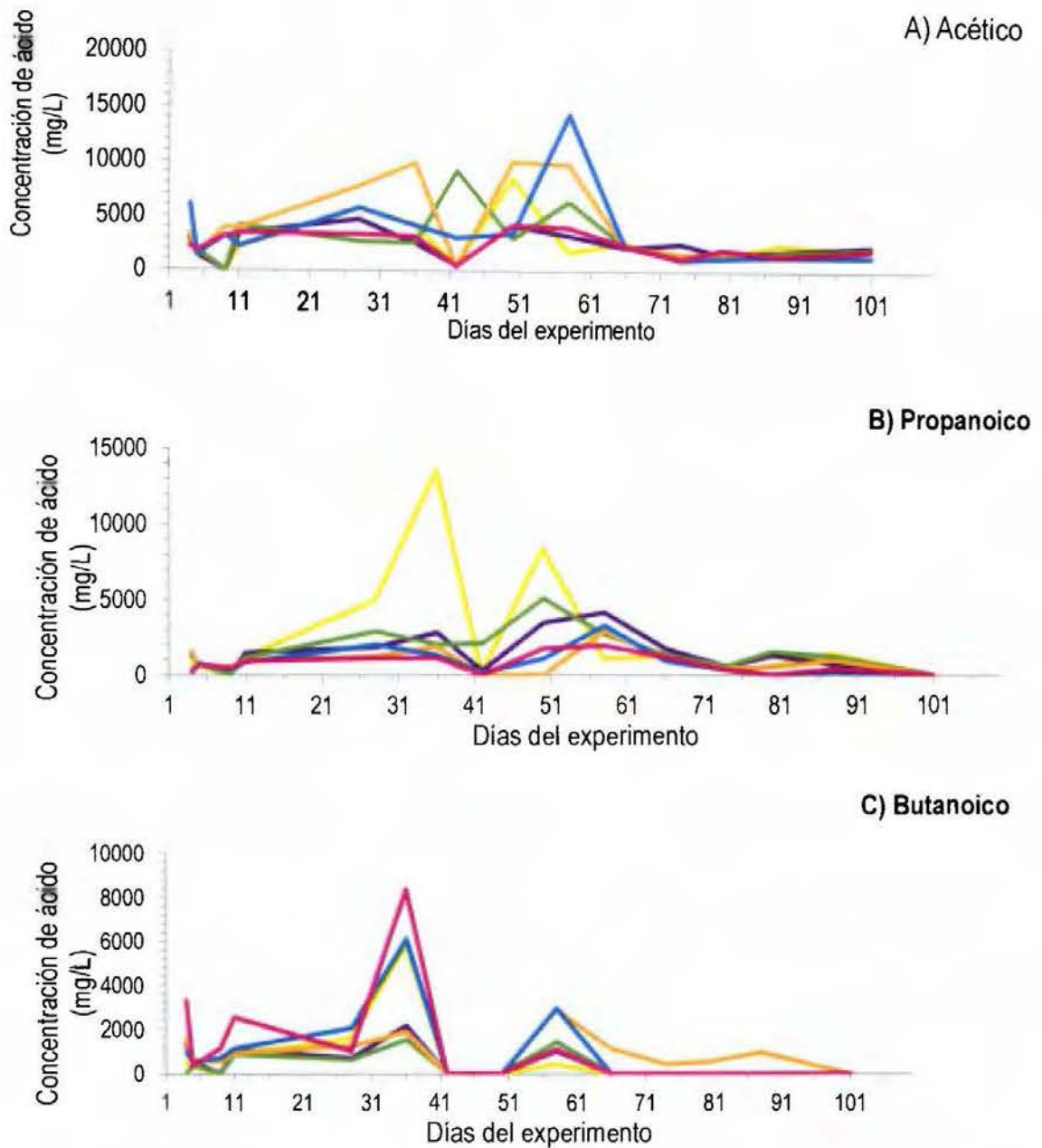
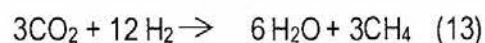
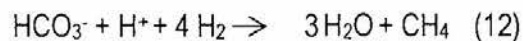


Figura 22. Gráficos de la concentración de los AGV de interés y totales obtenidos durante el desarrollo del experimento A) ácido acético, B) ácido propanoico y C) ácido butanoico. ---100 a 35 °C, --90 :10 a 35 °C, ---80:20 a 50°C, ---100 a 50 °C, --90 :10 a 50°C y ---80:20 a 50°C, con % CV entre 5 % y 10 %.

Los biodigestores se estabilizaron aproximadamente desde el día 60 de operación hasta el día 120, cuando finalizó el experimento. En un estudio realizado por Molinuevo *et al* (2010), se obtuvo máximos de producción cercano al día 10 de operación, y la estabilización a partir del día 40, además concentraciones máximas de aproximadamente 10 000 mg /L, con un sustrato a base de estiércol de cerdo, es decir a pesar que los biodigestores presentaron comportamientos similares, los periodos de estabilización dependerán en cada caso de las condiciones de operación propiamente. Se observa también que cerca del día 61, las concentraciones de ácido acético y propanoico, se mantuvieron constantes, y la de butanoico decreció hasta valores no detectables por el método.

Las concentraciones altas de AGV, al inicio se deben principalmente a la degradación de la materia orgánica, la cual está en mayor concentración al inicio, conforme las macromoléculas se degradan los precursores del metano son accesibles y la producción de metano aumenta, se estabilizan las reacciones enzimáticas responsables de la metanogénesis, tal como lo muestran las ecuaciones desde la 11 hasta la 13.^{70,71}



4.2. Composición del biogás:

En general se observa un comportamiento complementario entre los AGV y la composición del biogás. En la cúspide de la producción de ácido acético, es decir cerca del día 61 aproximadamente, es cuando se empieza a mantener constante la composición de biogás, con un porcentaje de metano cercano al 74 %.

Las concentraciones de metano en el biogás oscilaron entre 56 % hasta 74 %. Tal como se muestra en la Figura 23, la concentración de metano del biogás se mantuvo constante a partir del

día 60 aproximadamente, lo que concuerda con el aumento de la concentración de ácido acético y el periodo de estabilización de las concentraciones de AGV. Los porcentajes de metano y dióxido de carbono en el biogás concuerdan con otros reportados en la literatura, donde el porcentaje de metano oscila entre un 60 % y 75% .^{29,72}

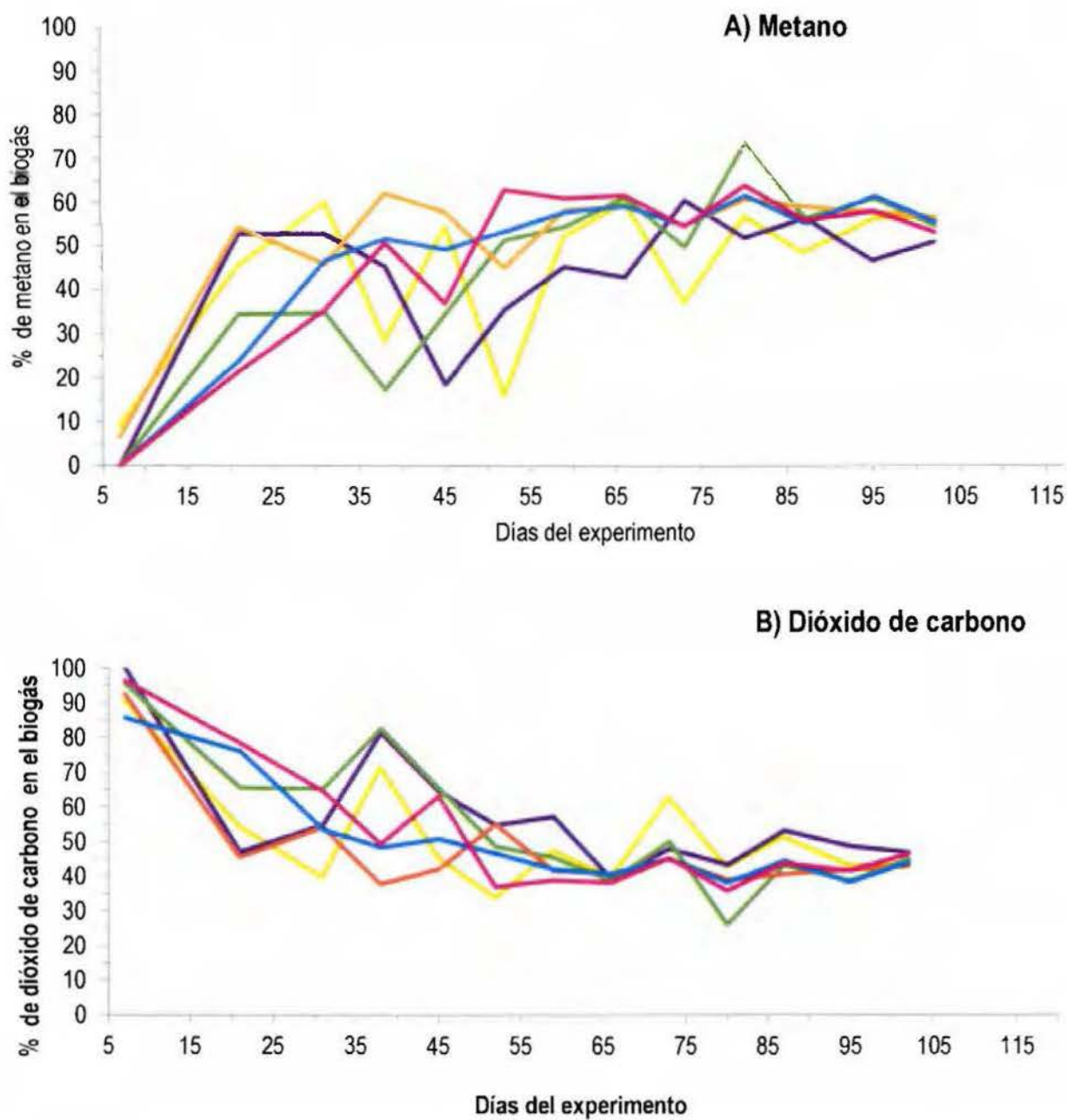


Figura 23. Composición del biogás a lo largo del desarrollo del experimento A) Metano, B) Dióxido de carbono, ---100 a 35 °C, ---90 :10 a 35 °C, ---80:20 a 35°C, ---100 a 50 °C, ---90 :10 a 50°C y ---80:20 a 50°C, con un % CV de 0.6 % y 0,9 % respectivamente.

Dado que los biodigestores se alimentaron con las mismas mezclas, y el pH se controló diariamente, las únicas diferencias que se esperaba tuvieran influencia en los resultados, constituyen la composición del sustrato y la temperatura de operación, el Cuadro XVI, resume las características promedio de los sustratos en términos de composición, así como los valores totales para cada proporción de sustrato.

Los resultados del Cuadro XVIII, muestra valores promedio de contenido de nitrógeno y carbono, similares, en las mezclas utilizadas como sustratos, se observa que el contenido de carbono es mayor para la proporción con mayor porcentaje de residuos de comida.

Los porcentajes de carbono orgánico son ligeramente diferentes para el porcentaje de glucano, xilano y lignina. El glucano y xilano son polisacáridos lineales (ver estructuras en anexo 8), mientras que la lignina es un polímero con una estructura más compleja, por esta razón se considera que sustratos con mayor contenido de lignina, son más difíciles de degradar, la fuerza de los enlaces y el tamaño de las moléculas lo dificulta.⁷³

Cuadro XVIII. Caracterización de los sustratos utilizados para el establecimiento de los reactores al inicio del ensayo.⁷⁴

Parámetro	Boñiga	Gallinaza	Frutas y vegetales	Alimentos preparados	Total en las mezclas		
					100	90:10	80:20
Contenido C (%)*	36,9	38,9	42,0	45,7	37,9	38,5	40,7
Contenido N (%)*	2,3	3,9	2,6	3,3	3,1	3,1	3,2
Relación C/N*	15,8	9,9	16,2	13,8	12,9	13,1	13,1
Sólidos totales (%ST)	13,2	85,0	8,3	33,6	49,1	46,3	45,5
Glucano equivalente (%ST)	14,7	25,3	18,6	55,9	20,0	21,7	25,2
Xilano equivalente (%ST)	12,6	9,4	7,5	2,9	11,0	10,4	8,2
Lignina (%ST)	27,3	6,79	21,8	11,4	17,0	17,0	14,3

*Promedio de dos lotes de sustratos diferentes.

Cabe esperar que el sustrato cuya composición era de 80 % estiércol y 20 % residuos de comida, sea el que genere metano más rápidamente, pues su contenido de C es más alto y el porcentaje de lignina es el menor, lo cual concuerda con lo observado en la Figura 23, en esta se evidencia que para las dos condiciones de temperatura, la proporción 80:20 tiene los picos más altos de porcentaje de metano, después del periodo de estabilización, seguido por la composición de 90:10, la cual presentó tendencias ligeramente por debajo de las de los biodigestores de 80:20. Finalmente, los biodigestores que funcionaban con 100 % estiércol, presentaron % de CH₄ ligeramente menores que las otras condiciones.⁷⁴

Las tendencias observadas en la Figura 23, no solo concuerdan con que a mayor porcentaje de lignina menor % de CH₄, sino que permite correlacionar que a mayor porcentaje de carbono mayor % CH₄ en el biogás. En la Figura 24, se observa que la productividad de biogás diaria es mayor para las proporciones de sustrato con mayor contenido de residuos de comida en los sustratos, tal como se describió en los párrafos anteriores.

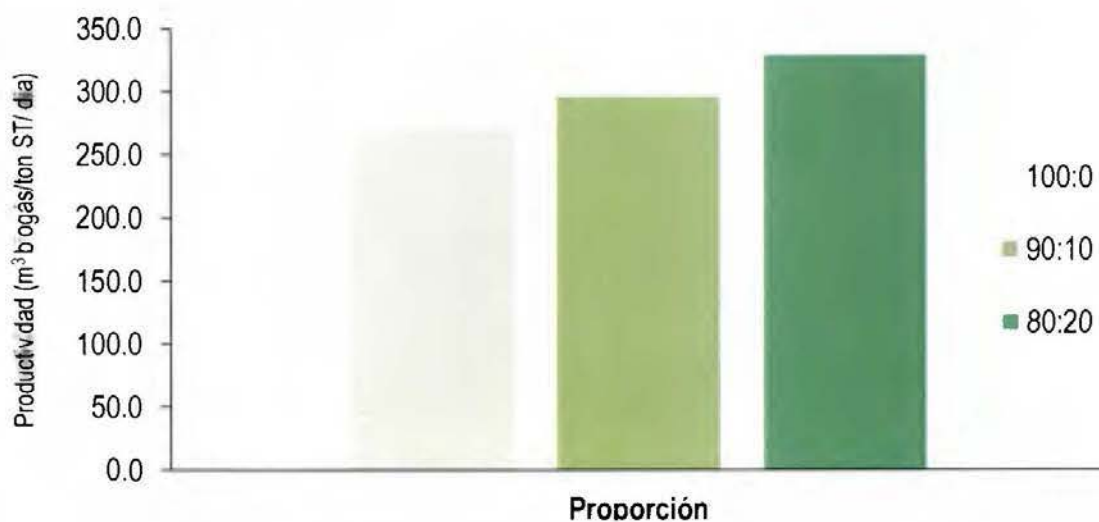


Figura 24.Productividad diaria de los sistemas en relación a la composición de los sustratos.⁷⁴

En la Figura 25, se muestra la producción de biogás en función de la temperatura de operación, y evidencia que para la temperatura de operación de 50°C la proporción de biogás es mayor; este comportamiento se debe a varias razones, la primera es que al aumentar la temperatura de 35 °C a 50 °C, la solubilidad de algunos componentes de los sustratos aumenta ligeramente, y los organismos responsables de la primera fase de hidrólisis son diferentes para cada temperatura de operación.

Dado que los biodigestores, a pesar de depender de las actividades de los microorganismos, se pueden considerar sistemas en sí mismos, y el efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano se puede describir por medio de la ecuación de Arrhenius:

$$K_T = K_{20^{\circ}C} \theta^{(T-20^{\circ}C)} \quad (14)$$

K_T y $K_{20^{\circ}C}$ son las velocidades del metabolismo a la temperatura T y a $20^{\circ}C$, es una constante, por lo tanto se espera que las bacterias termofilicas presenten una tasa de crecimiento mayor que las mesofilicas, lo cual influye directamente en la cantidad de enzimas responsables de los procesos metanogénicos, generando un impacto directo sobre la estabilización de los sistemas y la concentración de los productos.⁷⁹

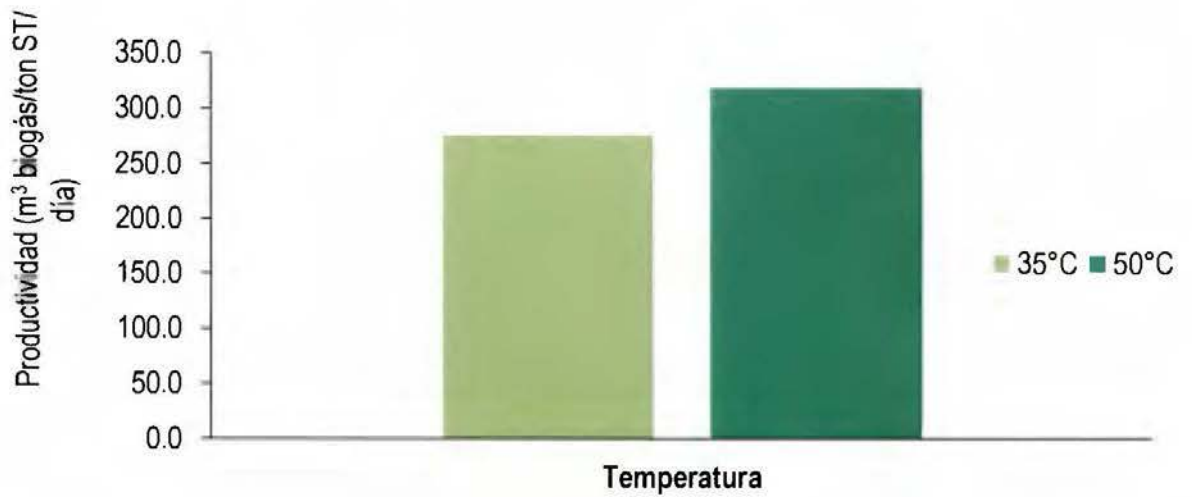


Figura 25.Productividad diaria de los sistemas en relación a la temperatura.⁷⁴

Además se determinó la presencia de diferentes tipos de microorganismos en los biodigestores según las condiciones de operación, lo cual explica la diferencia de productividad entre las condiciones termofilicas y mesofilicas. Yu *et al.*, (2014), llegaron a la misma conclusión, los microorganismos termofilicos tienen una mayor capacidad para procesar la materia orgánica, que obedece a la diferencia entre las enzimas segregadas por cada tipo de microorganismos.⁷⁵

4.3 Comparación de condiciones mesofílicas, termofílicas y los diferentes sustratos:

Para ser utilizado como fuente de energía, el gas que funciona como combustible es el metano y aunque un sistema genere gran cantidad de biogás, la proporción CH_4/CO_2 , es la que regirá cual sistema es más rentable en términos de energía.

Al ver las tendencias de la Figura 23, se infiere que las condiciones que generaron mayor porcentaje de metano fueron las que poseían como composición de sustrato 80 % estiércol y 20 % residuos de comida a 35 °C, seguido por las condiciones de 80:20 a 50 °C, estas últimas condiciones de operación se considerarían como la mejor tomando en cuenta la información desplegada en la Figura 25, pues a 50 °C la productividad de biogás fue mayor.

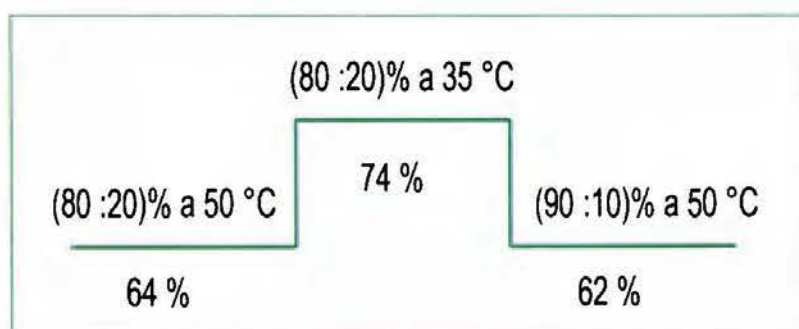


Figura 26. Condiciones en las cuales se obtuvieron el mayor porcentaje de metano en el biogás.

La Figura 26, solo muestra porcentajes máximos; lo cual es puntual y no permite la comparación objetiva de los resultados a través del tiempo, es preciso hacer un análisis estadístico de los datos a través de todo el período de funcionamiento de los biodigestores para elegir una condición sobre la otra.

Para decidir que prueba estadística utilizar es preciso conocer la naturaleza de la distribución de los datos, es decir si poseen una distribución normal o no. En caso que la distribución de los datos

sea normal, se puede aplicar una prueba de ANOVA, en el caso de que los datos no presenten una distribución normal, se debe recurrir a pruebas de comparación estadística no paramétricas como la de Kruskal Wallis o la de Friedman, que son homólogas a la prueba de ANOVA para distribuciones no paramétricas. Para hacer el análisis de estadístico de los datos, se utilizó el programa Minitab 15 Español.⁷⁶

La Figura 27, se construyó con los datos de los seis biodigestores, durante el periodo de estabilización, es decir, a partir de la semana 9; y muestra que la distribución de los datos no es normal, pues el valor de p normalidad es menor a 0,05. (Ver Anexo 6 para revisar las distribuciones de los datos individuales para cada condición de operación).

Para aplicar pruebas estadísticas de significancias, es preciso establecer una hipótesis, en este caso la hipótesis nula es que no existe diferencia significativa entre los resultados de porcentaje de metano para los seis tratamientos estudiados y la hipótesis alternativa es que si existe diferencia significativa entre los resultados.

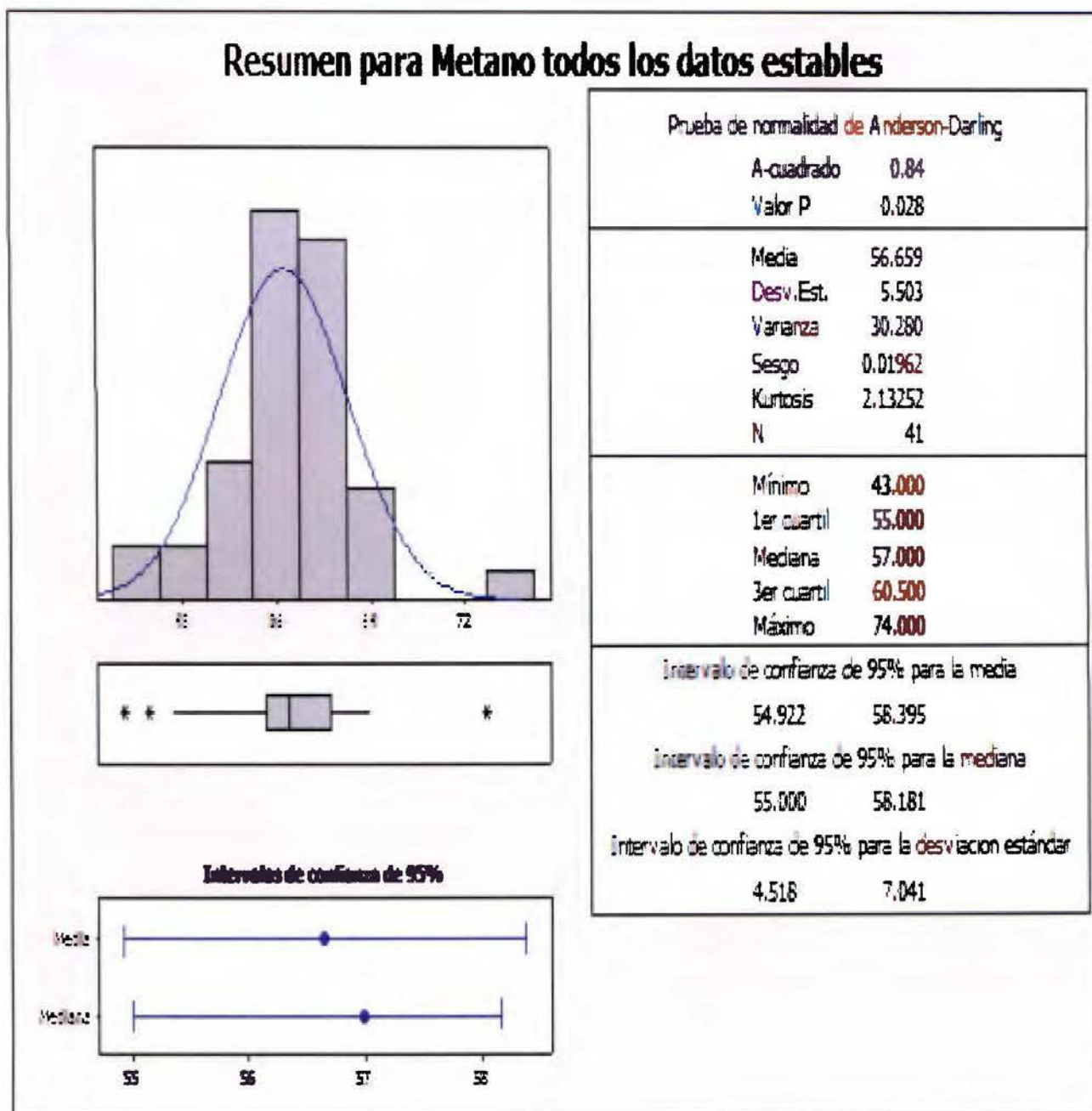


Figura 27. Distribución de todos los datos de porcentaje de CH₄ a partir de la semana 9 hasta la semana 15.

Friedman Test: % CH4 versus Composiciones de sustrato blocked by Temperatura

S = 1.00 DF = 2 P = 0.607

S = 2.00 DF = 2 P = 0.368 (adjusted for ties)

Composiciones de sustrato	N	Est	Median	Sum of Ranks
100 % estiercol	2		55.500	4.0
80 % estiercol 20 % residuos de comida	2		58.500	5.0
90 % estiercol 10 % residuos de comida	2		54.500	3.0

Grand median = 56.167

Kruskal-Wallis Test on % Metano

% Estiercol-Temperatura	N	Median	Ave Rank	Z
100 % - 35	7	57.00	15.9	-1.33
100 % - 50	7	58.00	26.1	1.10
80 % - 35	7	57.00	23.8	0.54
80 % - 50	7	58.00	26.1	1.08
90 % - 35	7	51.00	11.6	-2.35
90 % - 50	7	58.00	25.6	0.96
Overall	42		21.5	

H = 9.05 DF = 5 P = 0.107

H = 9.14 DF = 5 P = 0.104 (adjusted for ties)

Figura 28. Resultados de la prueba de Friedman y Kruskal-Wallis para el porcentaje de metano de los seis tratamientos diferentes de operación.

Como muestra la Figura 28, el valor obtenido de p es de 0,607 para la prueba de Friedman y de 0,107 para la de Kruskal-Wallis; en ambos casos es superior a 0,05; por lo tanto se retiene la hipótesis nula y se considera que los seis tratamientos generan porcentajes de metano sin diferencia significativa. En la Figura 29, se observa el mismo comportamiento, gráficamente se puede llegar a la conclusión de que las diferencias no son significativas pues se puede trazar una línea recta que interseca a todos los subgrupos.

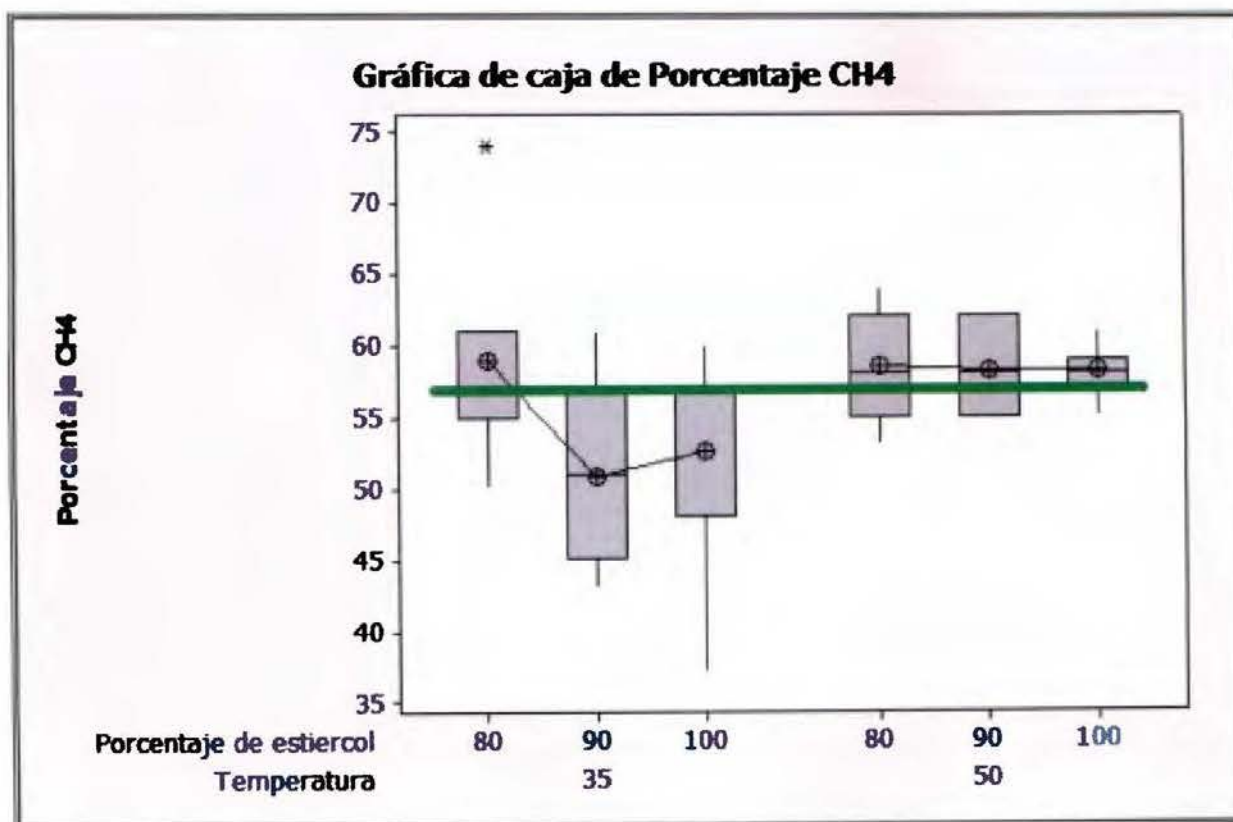


Figura 29. Gráfico de barras de los resultados del análisis estadístico para la composición de metano de los seis tratamientos estudiados.

De la representación gráfica de la Figura 29, se puede concluir también, que la variabilidad de los datos fue mayor para los biodigestores que operaron a 35 °C, respecto de los que operaron a 50 °C, por lo tanto estos últimos se consideran menos variables, lo cual es mucho más favorable para controlar un proceso. Incluso los valores de porcentaje de metano promedio de los biodigestores que operaron a 50 °C, fueron más altos que los que operaron a 35 °C.

El gráfico revela que los porcentajes promedio de metano en el caso de los biodigestores que operaron a 50 °C, es decir en condiciones termofílicas son prácticamente constantes, independientemente de la composición del sustrato, y que la variabilidad entre los biodigestores de composición de sustrato 90 % estiércol y 10 % residuos de comida y los de 80% estiércol y 20 % residuos de comida es muy similar. Para el caso de los biodigestores que operaron a 35 °C los resultados promedio son diferentes.

Los datos con mayor variabilidad fueron los obtenidos para el biodigestor que operó a 35 °C con una proporción de sustrato de 90 % estiércol y 10 % residuos de comida, mientras que el que obtuvo resultados con menor variabilidad fue el que operó a 50 °C con una composición de sustrato de 100 % estiércol.

Al analizar los resultados de forma global, es claro que trabajar en condiciones termofílicas, para este caso a 50 °C, permite alcanzar un sistema menos variable y que además rinde porcentajes de metano mayores que a 35 °C, si a esto se adiciona el hecho de que los sustratos con mayor porcentaje de comida, presentaron mayor productividad de biogás, la elección de las condiciones de operación más favorables son claras: 80 % estiércol 20 % residuos de comida y 50 °C como temperatura de operación.

5. Conclusiones y recomendaciones

- Con el análisis de los datos, se concluye que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con las seis condiciones de operación, sin embargo la mayor productividad de biogás se obtuvo con el biodigestor que operó a 50 °C con la composición de sustrato de 20 % residuos de comida y 80 % estiércol.
- Los biodigestores se comportaron de la forma esperada, es decir con un aumento de la concentración de AGV en las primeras etapas de degradación de materia orgánica, hasta estabilizarse cerca de la semana nueve, y posteriormente un aumento del porcentaje del metano en el biogás que también se mantuvo constante, y una disminución de la concentración de AGV, que son los principales precursores del biogás. El comportamiento de la concentración de los AGV, presentó congruencia con la evolución de la composición de biogás a lo largo del período de operación de los biodigestores. A menor concentración de AGV, mayor proporción de metano en el biogás.
- Se observó que los sustratos con mayor porcentaje de residuos de comida fueron más productivos que los que presentaron mayor porcentaje de estiércol, debido a que estos presentaban mayores porcentaje de carbono y menor porcentaje de xilano y lignina, polímeros que son más difíciles de digerir.
- Se cumplieron los valores meta establecidos para las figuras de mérito de los parámetros de desempeño, tanto para la cuantificación de AGV como para la determinación de la composición de biogás.
- Los biodigestores que operaron a 50 °C, presentaron porcentajes promedio de metano más altos que los que operaron a 35 °C, así como resultados con menor variabilidad.
- Los errores de exactitud presentes en los resultados de la cuantificación de AGV se deben a los porcentajes de recuperación ligeramente bajos obtenidos de las extracciones con éter etílico .

- En la determinación de la composición de biogás se utilizó como gas de arrastre helio, debido a que el nitrógeno puede desplegar señales negativas para gases que tengan una conductividad mayor, razón por la cual la sensibilidad de los analitos varía, mientras que el helio aumenta la sensibilidad de la respuesta de los analitos.

- Para análisis de AGV, la literatura y los resultados demostraron que la cromatografía de GC con detector de FID es de una de las técnicas más utilizadas, sin embargo es de las técnicas que presentan mayores límites de detección. En el caso en estudio, los resultados se consideran aceptables para la evaluación de las concentraciones de muestras como las generadas.

- Es recomendable para garantizar la representatividad de los datos que las mediciones de biogás se realicen en línea, y a lo largo del día, pues las variaciones de presión del espaciado de cabeza, y la solubilidad de los gases, varía la composición del biogás a lo largo del tiempo. Incluso la toma de la muestra de gas en si genera desequilibrios en la presión del sistema, pues se extrae el gas que forma parte del espaciado de cabeza, lo que altera el equilibrio presente en el biodigestor.

- Para contrarrestar estas alteraciones se debería optimizar un sistema que recoja el biogás generado y monitoree al menos una vez cada hora las diferencias de presión, una vez alcanza cierta presión limite se tomara la muestra y se analizara, para evitar hacer vacío con la bomba para la toma de muestras.

- El proceso de extracción con disolventes orgánicos, no es la mejor opción debido a que la eficiencia de la extracción no es alta y no es un método robusto. Además presenta un costo ambiental pues se generan desechos. Es recomendable utilizar técnicas de extracción en fase sólida como el headspace (espaciado de cabeza), las cuales también automatizan los procesos de extracción, disminuyendo el tiempo de preparación de muestra. En el caso del análisis de AGV, la reproducibilidad de las muestras es un factor difícil de controlar, al tratarse de sistema muy variable.

- Dentro de los parámetros de validación que se pueden incluir en una validación más extensa, pruebas de selectividad de los analitos de interés, sin embargo la complejidad de la matriz, podría hacer engorrosas las pruebas. Para ello se pueden comparar los resultados de materiales de referencia y muestras entre dos métodos diferentes, como la valoración o la destilación.

- Para la evaluación de la precisión en validación se consideran la repetibilidad y la reproducibilidad; en el caso del método para la determinación de la composición de biogás, se evaluó la precisión a corto plazo o repetibilidad, no fue posible evaluar la precisión intermedia, para la cual se recomienda analizar al menos siete muestras independientes iguales, en el caso del experimento solo se contó con dos réplicas y dado la naturaleza del experimento asegurar que a lo largo del tiempo las muestras eran exactamente iguales no fue posible.

- Aunque los resultados fueron adecuados en la determinación de AGV, si se quiere conocer con mayor exhaustividad la robustez de este método, se recomienda para presentar una evaluación de precisión más completa correr pruebas de reproducibilidad, al menos incluyendo como variable el analista, ya que este método es utilizado por diferentes operadores, o al menos correr el método con equipos diferentes para una misma muestra. No se evaluó la reproducibilidad, pues no se pudo tener una muestra estable en el tiempo suficiente como para que se pudiera analizar por otro laboratorio o en otro equipo. Se podría evaluar la precisión del método de forma más completa si se trabajara con más réplicas de los tratamientos, incluso una vez elegidas las condiciones de operación, se podría establecer 6 reactores en igualdad de condiciones y hacer un estudio de reproducibilidad.

Se recomienda para hacer una determinación de la robustez más completa por medio de un análisis de las principales factores que pueden afectar la determinación del analito o valor de interés, y posteriormente construir un diseño de experimentos que contemple las principales variables.

La prueba de Youden es internacionalmente aceptada como método de evaluación de los factores influyentes en las determinaciones de los métodos. Se recomienda la evaluación de siete factores por cada uno evaluado en los valores extremos, es decir uno alto y otro bajo. Los Cuadro XIX y Cuadro XX, son modelos de diseños de experimentos propuestos para el análisis de las AGV y la composición de biogás. Además hubiera sido ideal correr una validación paralela del método de extracción de AGV, que incluyera un estudio de robustez aparte.

Cuadro XIX. Diseño de experimento propuesto para la evaluación de la robustez del método para la evaluación de la composición de biogás.

Análisis de la composición de biogás							
Temperatura inicial rampa (°C)	Velocidad de la rampa (°C/min)	Día de análisis	Temperatura del inyector (°C)	Temperatura del detector (°C)	Flujo del gas de arrastre (mL/min)	Gas de arrastre	Temperatura inicial rampa (°C)
95	12	1	205	230	5	Nitrógeno	95
95	17	2	195	225	5	Nitrógeno	95
105	17	1	205	225	3	Nitrógeno	105
105	12	1	195	225	5	Helio	105
95	12	2	205	225	3	Helio	95
95	17	1	195	230	3	Helio	95
105	17	2	205	230	5	Helio	105
105	12	2	195	230	3	Nitrógeno	105

Cuadro XX. Diseño de experimento propuesto para la evaluación de la robustez del método para la cuantificación de AGV.

Análisis de la concentración de AGV							
Temperatura del horno (°C)	Temperatura del inyector/detector (°C)	Día de análisis	Volumen de inyección (µL)	P N ₂ (kPa)	P H ₂ (kPa)	P aire (kPa)	Temperatura del horno (°C)
205	285						
195	285	1	0.5	105	95	40	195
195	275	1	1.5	105	105	30	195
205	285	1	1.5	95	95	30	205
205	275	2	0.5	105	95	30	205
205	275	1	0.5	95	105	40	205
195	275	2	1.5	95	95	40	195
195	285	2	0.5	95	105	30	195

Bibliografía

1. Schmersahl, R., Mumme, J. & Scholz, V. Farm-Based Biogas Production , Processing , and Use in Polymer Electrolyte Membrane (PEM) Fuel Cells. 8946–8950 (2007).
2. White, A. J., Kirk, D. W. & Graydon, J. W. Analysis of small-scale biogas utilization systems on Ontario cattle farms. *Renew. Energy* **36**, 1019–1025 (2011).
3. Keshtkar, A., Ghaforian, H., Abolhamd, G. & Meysami, B. Dynamic simulation of cyclic batch anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresour. Technol.* **80**, 9–17 (2001).
4. Real Academia Española. Diccionario de la Real Academia Española. *Definiciones* (2010). at <<http://lema.rae.es/drae/?val=biogás>>. 12/05/2012.
5. Zhou, Y. *et al.* Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. *Biomass and Bioenergy* **35**, 3251–3256 (2011).
6. Varnero Moreno, M. T. *Manual del Biogás*. 119 (2011).
7. Magaña. R, J., Torres. R, E., Martínez. G, M. T., Sandoval. J, C. & Cantero. Hernández, R. Producción de Biogás a Nivel Laboratorio Utilizando Estiércol de Cabras. *Red Rev. científicas América Lat. y el Caribe, España y Portugal* **16**, 27–37 (2006).
8. Lobera. L, J. B. *Historia del Biogás*. 1–12 (Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, (2011).
9. Raven, R. P. J. M. & Gregersen, K. H. Biogas plants in Denmark: successes and setbacks. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **11**, 116–132 (2007).
10. Chen, L., Zhao, L., Ren, C. & Wang, F. The progress and prospects of rural biogas production in China. *Energy Policy* **51**, 58–63 (2012).

11. Walekhwa, P. N., Mugisha, J. & Drake, L. Biogas energy from family-sized digesters in Uganda: Critical factors and policy implications. *Energy Policy* **37**, 2754–2762 (2009).
12. Nzila, C. *et al.* Multi criteria sustainability assessment of biogas production in Kenya. *Appl. Energy* **93**, 496–506 (2012).
13. Sanscartier, D., MacLean, H. L. & Saville, B. Electricity production from anaerobic digestion of household organic waste in Ontario: techno-economic and GHG emission analyses. *Environ. Sci.-Technol* **46**, 1233–1242 (2012).
14. Nizami, A.-S., Korres, N. E. & Murphy, J. D. Review of the integrated process for the production of grass biomethane. *Environ. Sci. Tech* **43**, 8496–8508 (2009).
15. Kumar. Dhaked, R., Singh, P. & Singh, L. Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waste Manag.* **30**, 2490–2496 (2010).
16. Rivas. S, O., Faith. V, M. & Guillén. W, R. Biodigestores: factores químicos , físicos y biológicos relacionados con su productividad. *Tecnol. en marcha* **23**, 39–46 (2010).
17. Instituto de Investigaciones Porcinas. Biodigestores. *Bol. Tec. Porc.* **Mayo**, 1–14 (2007).
18. Martí. H, J. *Biodigestores familiares: guía de diseño y manual de instalación*. Cooperación Técnica Alemana, (2008).
19. United States Environmental Protection Agency. Green house gas emissions. (2012). at <<http://www.epa.gov/climatechange/emissions/#inv>> .13/04/2013.
20. Boltes, K., Leton, P. & Garcia-Calvo, E. Volatile Fatty Acid Anaerobic Degradation: Kinetic Modeling with an Inoculum under Controlled Conditions. *Ind. Engi.Chem.Res* **47**, 5337–5345 (2008).

21. Bari, S. Effect of carbon dioxide on the performance of biogas/diesel dual -fuel engine. *Sch. Mech. Eng. Univ. Sains MA laysia* 1007–1010 (1996).
22. Bermúdez, J. ., M, C., Manjón, A. & Howell, J. *La digestión anaerobia*. Universidad de Murcia, (1988).
23. Parés, R. & Juárez, A. *Bioquímica de loa microorganismos*. Barcelona, (2002).
24. Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I. & López-Sabater, M. C. Volatile compounds and fatty acid profiles in commercial milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography: Evolution after opening the packet. *Food Chem.* **107**, 558–569 (2008).
25. Siegert, I. & Banks, C. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* **40**, 3412–3418 (2005).
26. Marcos, a., Al-Kassir, a., López, F., Cuadros, F. & Brito, P. Environmental treatment of slaughterhouse wastes in a continuously stirred anaerobic reactor: Effect of flow rate variation on biogas production. *Fuel Process. Technol.* **103**, 178–182 (2012).
27. Bradley, F., Amstrong, T. & Bennett, T. . *Biochemistry*. Oxford University Press, (1982).
28. Lu, S., Imai, T., Ukita, M. & Sekine, M. Start-up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes. *J. Environ. Sci. (China)* **19**, 416–20 (2007).
29. Boe, K., Batstone, D. J., Steyer, J.-P. & Angelidaki, I. State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Res.* **44**, 5973–80 (2010).
30. Wade, L.G, J. . *Química Orgánica*. 71 (2004).
31. Mc Murry, J. *Química Orgánica*. CENGAGE Learnig, 750–752 (2000).

32. Hutjens, M. *Guía de Alimentación*. Hoard's Dairyman Books, (2003).
33. Mora . B, I. *Nutrición animal*. 43 Universidad Estatal a Distancia, (2007).
34. Parajuli, P. Biogas measurement techniques and the associated errors. (2011).
35. Gilroyed, B. H. *et al.* Anaerobic digestion of specified risk materials with cattle manure for biogas production. *Bioresour. Technol.* **101**, 5780–5 (2010).
36. Van Rijn, J., Fonarev, N. & Berkowitz, B. Anaerobic treatment of intensive fish culture effluents: digestion of fish feed and release of volatile fatty acids. *Aquaculture* **133**, 9–20 (1995).
37. González . E, G., Roeckel . von B, M., Sanhueza. M, V., Vargas. A, D. & Aspé. L, E. Medición de ácidos grasos volátiles mediante la degradación anaerobia de un vertido salino. *Univ. Concepción Chile* (2009).
38. Innocente, N., Moret, S., Corradini, C. & Conte, L. S. A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3321–3 (2000).
39. Feitkenhauer, H., Von, S. J. & Meyer, U. On-line titration of volatile fatty acids for the process control of anaerobic digestion plants. *Water Res.* **36**, 212–8 (2002).
40. Palacio-Barco, E., Robert-Peillard, F., Boudenne, J.-L. & Coulomb, B. On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes. *Anal. Chim. Acta* **668**, 74–9 (2010).
41. Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Ferreira, M. a. Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese. *Anal. Chem.* **74**, 5199–204 (2002).

42. Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R. & Larroche, C. Bioresource Technology Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* (2012).
43. Amend, J. A. N. P., Amend, A. C., Valenza, M., Palermo, Á. & Applicazioni, T. Determination of volatile fatty acids in the hot springs of Vulcano , Aeolian Islands , Italy. **28**, 699–705 (1998).
44. Balmer, A. & Martin, P. *Synthetic Biology: Social and Ethical Challenges*. 1–36, Institute for Science and Society University of Nottingham, (2008).
45. Pang, Y. Z., Liu, Y. P., Li, X. J., Wang, K. S. & Yuan, H. R. Improving Biodegradability and Biogas Production of Corn Stover through Sodium Hydroxide Solid State Pretreatment. *Energy & Fuels* **22**, 2761–2766 (2008).
46. Liu, C.-Z. & Cheng, X.-Y. Microwave-Assisted Acid Pretreatment for Enhancing Biogas Production from Herbal-Extraction Process Residue. *Energy & Fuels* **23**, 6152–6155 (2009).
47. Raheman, H. & Mondal, S. Biogas production potential of jatropha seed cake. *Biomass and Bioenergy* **37**, 25–30 (2012).
48. Van Loon, R. Analysis of biogas using the Agilent 490 micro GC biogas analyzer. Application Note. *Agil. Technol.* (2011).
49. Morante Zarcero, S., Sierra Alonso, I. & del Hierro Morales, I. *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*. Universidad Rey Juan Carlos, (2007).
50. Clavijo Díaz, A. *Fundamentos de química analítica, equilibrio iónico y análisis químico*. Universidad Nacional de Colombia, (2002).

51. Sierra Alonso, I., Perez Quintanilla, D., GómezRuiz, S. & Morante Zarcero, S. *Análisis instrumental*. NETBIBLO, (2010).
52. Oficina de las Naciones Unidad contra la Droga y el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautos y especímenes biológicos. (2010).
53. Linealidad, I. D. E. *et al.* Guia de validación de metodos analiticos. 1–18, (1996)
54. Valcárcel Cases, M. & Gómez Hens, A. *Técnicas Análíticas de separación*. Reverté, (1988).
55. Skoog, A., Holler, J. & Crouch, S. *Principios de análisis instrumental*. CENGAGE Learning, (2008).
56. Barquero Quirós, M. *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. Universidad de Costa Rica, (2006).
57. QuimNET.com. No Title. *Hist. la Cromatogr.* (2012). at <http://www.quiminet.com/articulos/historia-de-la-cromatografia-de-gases-20851.htm>>25.04.2012
58. Miller, J. *Estadística y quimimimetría para química analítica*. (2002).
59. KeikaVentures. Layered Bags. (2012). at <http://www.skshopping.com/SearchResults.asp?Search=bags&Search.x=0&Search.y=0>. SKC, 2012. 3/05/2012
60. Buitrón, G. & Carvajal, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.* **101**, 9071–9077 (2010).

61. Amon, T. *et al.* Biogas production from maize and dairy cattle manure—Influence of biomass composition on the methane yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* **118**, 173–182 (2007).
62. Wang, X. & Road, Y. . *Simultaneous analysis of greenhouse gases by gas chromatography. Appl. Environ. Agil. Technol.* (Application environmental, Agilent technologies, 2010).
63. Universidad Central de Venezuela. Guia de cromatografía. *Esc. Química, Fac. Ciencias 11* (2008). at <<http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia para cromatografia.pdf>>
64. Air Liquide. La Enciclopedia Gas. (2013). at <<http://encyclopedia.airliquide.com/encyclopedia.asp?LanguageID=2&GasID=5#GeneralData>>
65. Carlos, U. R. J. *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica.* (2007).
66. Marín, L, J. C. *et al.* Optimización de un método para la determinación simultánea de H₂ y CH₄ por cromatografía gas-sólido en biorreactores anaeróbicos. *MULTICIENCIAS* **7**, 266–275 (2007).
67. Toledano, R, D., Llera, R. L., Piloto, R. R. Validacion de una metodología analítica mediante cromatografía de gases para la determinación de acidos grasos volátiles en residuales de la industria citrícola. *Rev. Tecnol. e Hig. los Aliment.* **ISSN 0300**, 25–30 (2003).
68. Raposo, F. *et al.* First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error. *TrAC Trends Anal. Chem.* **51**, 127–143 (2013).
69. Harris, D. *Análisis químico cuantitativo.* Reverté, (2003).

70. Aĝdaĝ, O. N. & Sponza, D. T. Co-digestion of mixed industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling bioreactors. *J. Hazard. Mater.* **140**, 75–85 (2007).
71. Molinuevo-Salces, B. *et al.* Anaerobic co-digestion of livestock wastes with vegetable processing wastes: a statistical analysis. *Bioresour. Technol.* **101**, 9479–85 (2010).
72. Molino, a., Nanna, F., Ding, Y., Bikson, B. & Braccio, G. Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. *Fuel* **103**, 1003–1009 (2013).
73. Warren, R. A. J. MICROBIAL HYDROLYSIS OF. *Annu Rev Microbiol* **50**: 183–212 (1996).
74. Murillo, R, M. *PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN MICROREACTORES OPERADOS A DOS TEMPERATURAS*. 71 (Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotécnica, (2014).
75. Yu, D. *et al.* Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *J. Environ. Manage.* **143**, 54–60 (2014).
76. Berenson, M. L., Levine, D. M. & Krehbiel, T. C. *Estadística para administración*. Mc Graw Hill, (2006).
77. González, E., Sanhueza, M., Vargas, A. & L, D. A. ANAEROBIA DE UN VERTIDO SALINO.
78. Zhao, S. Analysis of fatty acid methyl esters by Agilent 5975T LTM GCMS, Agilent Technologies, Shanghai,(2013).
79. Dieter, D; Steinhauser, A.; Biogas from waste and renewable resources. Wiley-VHC. (2011):
- 80 Mejía, S. G .Universidad autónoma de Yucatán, folleto técnico, digestión anaerobia, UADY, (1996)
81. Entrevista con la profesora de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica. Paulina Silva Trejos, evaluadora del Ente Costarricense de Acreditación. Julio 2012. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

ANEXO 1. Áreas de los cromatogramas obtenidos para la determinación de la composición de biogás.

Semana	Replica	100 % a 35 °C			(90 :10) % a 35 °C			(80 :20) % a 35 °C			100 % a 50 °C			(90 :10) % a 35 °C			(80 :20) % a 35 °C		
		A H ₂	A CH ₄	ACO ₂	A H ₂	A CH ₄	ACO ₂	A H ₂	A CH ₄	ACO ₂	A H ₂	A CH ₄	ACO ₂	A H ₂	A CH ₄	ACO ₂	A H ₂	A CH ₄	ACO ₂
2	A	ND	23,43617	34,33078	ND	0	26,2602	67,23201	0	45,54029	5,06297	ND	29,24926	149,54149	ND	43,1532	13,57858	ND	56,91121
	B	ND	3,2019	5,03337	ND	0	23,6857	ND	0	12,4693	5,46704	40,94798	41,30297	56,72036	ND	37,0634	51,9812	ND	60,69087
4	A	ND	193,26932	30,17487	ND	173,16843	27,72027	ND	3,60485	1,45337	ND	40,22572	6,78278	ND	145,94926	24,36996	ND	57,55810	11,69902
	B	ND	290,85172	63,04087	1,14048	37,28915	4,34438	ND	12,97751	2,81724	ND	201,5477	19,55437	8,25283	ND	1,70362	6,08459	ND	1,10605
5	A	ND	282,12718	29,944645	ND	85,173945	18,849625	ND	126,591275	37,556695	ND	58,03082	15,32826	ND	33,93280	9,13856	ND	42,126905	10,8703
	B	ND	467,597685	45,44683	ND	94,64927	14,76289	ND	82,776095	23,12776	ND	82,538005	10,35472	ND	158,251545	18,36335	ND	37,102545	11,22504
6	A	ND	143,04317	54,74449	ND	7,66071	6,4011	ND	19,56625	13,43239	ND	232,25789	19,88907	ND	103,60011	27,548	ND	99,13788	21,80931
	B	ND	60,2735	23,1153	ND	28,5305	15,8281	ND	14,6937	11,382	ND	470,51242	47,69649	ND	182,59653	13,93983	ND	470,51242	47,69649
7	A	ND	187,08035	23,41369	ND	9,77455	4,53442	ND	48,79140	17,48051	ND	144,97825	14,06207	ND	71,71360	15,19735	ND	61,94575	15,84518
	B	ND	88,91799	11,64125	ND	339,71121	60,74451	ND	16,30212	3,89047	ND	155,67718	19,87740	ND	8,17261	0,97226	ND	87,52537	23,49260
8	A	ND	0,000000	0,000000	ND	65,296230	8,355890	ND	23,755360	1,860230	ND	3,372970	1,026090	ND	11,497250	1,716260	ND	24,160890	2,145300
	B	ND	5,289640	1,703930	ND	18,706440	5,113750	ND	34,776130	9,294180	ND	42,445060	5,019600	ND	58,488530	7,003970	ND	96,671750	8,829280
9	A	ND	372,38354	55,29736	ND	121,74434	25,15787	ND	433,42535	43,6585	ND	365,58435	38,51869	ND	443,04571	49,39489	ND	499,72357	52,42368
	B	ND	464,95886	60,72902	ND	341,93303	69,37257	ND	479,57678	77,56953	ND	335,47162	38,20855	ND	431,65115	48,04174	ND	759,31744	69,01174
10	A	ND	567,36896	58,55671	ND	393,5151	40,72729	ND	349,15735	34,75935	ND	477,39081	50,78249	ND	577,22906	61,88694	ND	281,97333	25,84596
	B	ND	620,08215	61,86896	ND	617,09747	59,20414	ND	672,995	63,5317	ND	616,87042	64,46874	ND	506,93402	52,51929	ND	652,09473	63,97393
11	A	ND	455,50867	68,35201	ND	111,61862	16,32331	ND	117,6309	16,71926	ND	440,5989	54,80686	ND	343,32034	41,45372	ND	457,39029	58,23115
	B	ND	121,10497	58,9864	ND	506,60443	69,42463	ND	502,54602	84,45031	ND	513,57452	64,97823	ND	299,4491	39,61224	ND	122,73165	15,59752
12	A	ND	112,60471	14,21054	ND	23,2569	3,36721	ND	3625,87628	67,71703	ND	461,1633	44,11788	ND	511,466	47,7638	ND	269,694	22,053
	B	ND	255,352	27,1713	ND	634,346	60,33257	ND	507,74719	55,1282	ND	232,89418	23,71839	ND	469,55807	45,53889	ND	669,1546	60,33257
13	A	ND	61,16122	10,02706	ND	16,51887	3,58458	ND	60,9782	5,4567	ND	50,45597	6,2352	ND	1383,13696	174,45796	ND	1860,35291	207,63852
	B	ND	94,00444	15,25932	ND	61,46524	8,6721	ND	98,64012	15,15273	ND	60,9782	5,4567	ND	1019,34	123,11448	ND	177,66446	22,9449
14	A	ND	325,17212	34,90089	ND	7,64084	1,73527	ND	380,15179	36,39056	ND	430,4166	46,93874	ND	435,43988	45,8542	ND	384,35541	43,76147
	B	ND	23,17534	2,96507	ND	337,19122	31,1362	ND	285,41351	28,09959	ND	450,9178	50,95632	ND	21,65879	1,86165	ND	425,82474	45,14351
15	A	ND	302,259	36,28731	ND	101,62977	16,82757	ND	387,58948	47,72746	ND	271,8512	31,29489	ND	134,95895	15,42351	ND	278,39005	38,30818
	B	ND	191,5477	21,65185	ND	317,24341	35,27754	ND	344,63943	44,06005	ND	242,40411	28,41164	ND	265,30804	34,17194	ND	291,82498	37,78957

ANEXO 2. Composición de biogás para cada condición de operación de los biodigestores durante el experimento.

Semana	100 % a 35 °C		(90:10) % a 35 °C		(80:20) % a 35 °C		100 % a 50 °C		(90:10) % a 50 °C		(80:20) % a 50 °C	
	% CO ₂	% CH ₄	% CO ₂	% CH ₄	% CO ₂	% CH ₄	% CO ₂	% CH ₄	% CO ₂	% CH ₄	% CO ₂	% CH ₄
2	91	9	100	0	95	0	92	7	86	0	96	0
4	54	46	47	53	66	34	46	54	76	24	78	22
5	40	60	55	53	65	35	54	46	53	47	65	35
6	71	29	81	45	83	17	38	62	48	52	49	51
7	45	55	64	19	65	35	42	58	51	49	63	37
8	34	16	55	36	49	51	55	45	47	53	37	63
9	48	52	57	45	45	55	42	58	42	58	39	61
10	40	60	39	43	39	61	41	59	41	59	38	62
11	63	37	48	61	50	50	45	55	45	55	45	55
12	43	57	43	52	26	74	39	61	38	62	36	64
13	52	48	53	57	43	57	41	59	45	55	44	56
14	43	57	49	47	39	61	42	58	38	62	42	58
15	43	57	47	51	45	55	43	57	44	56	47	53

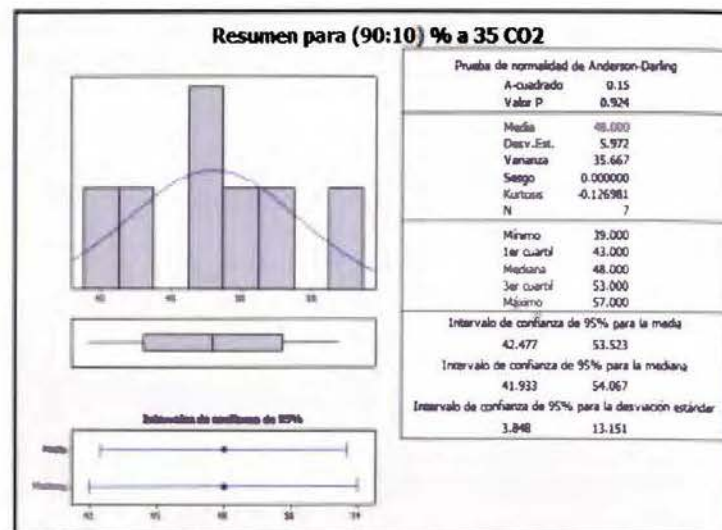
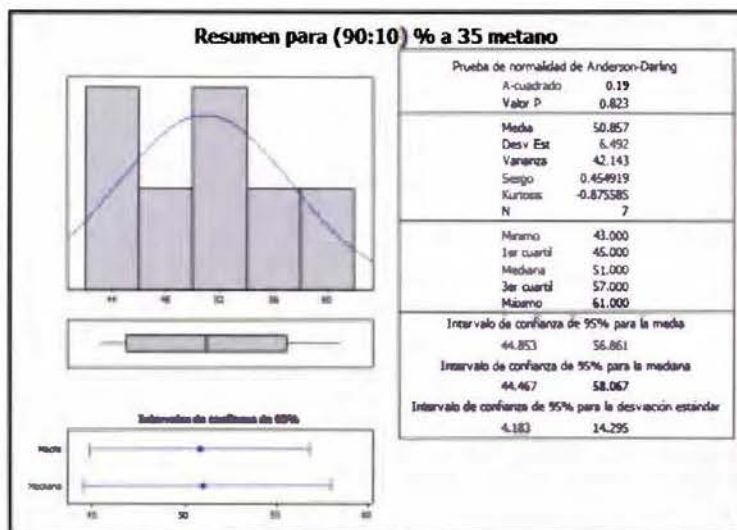
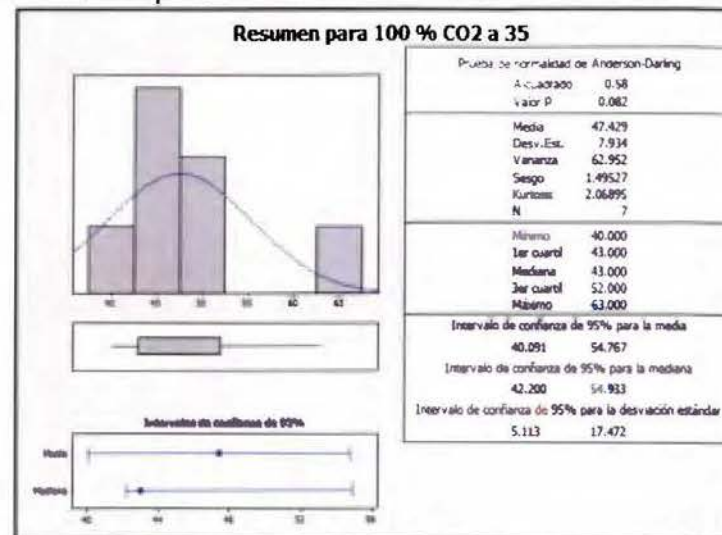
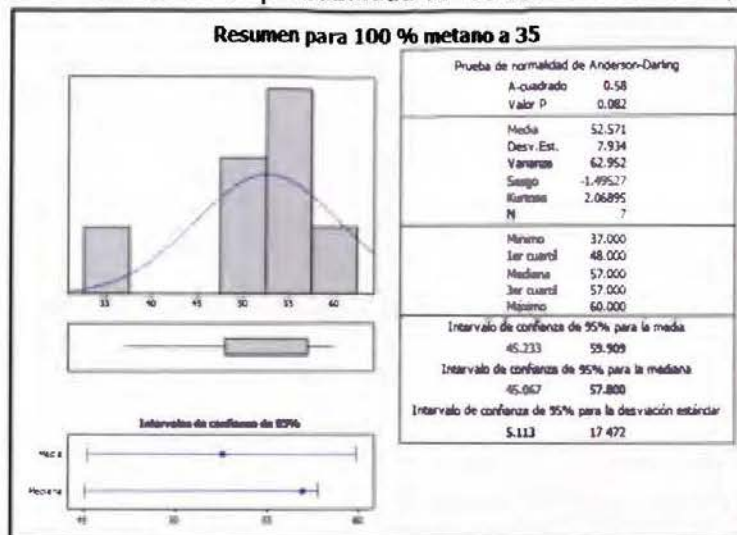
ANEXO3 Tablas con resultados de las concentraciones de AGV de las muestras

		Acido acético (mg/L)														
Temperatura de operación (°C)	Día	4	5	9	11	28	36	42	50	58	66	74	80	88	101	
	Composición de sustrato															
35	100	2771	1362	0	2236	5791	4256	486	8581	1746	2580	1090	1354	2490	2015	
35	90:10	2977	1417	0	3453	4763	2572	501	4205	3331	2187	2594	1547	1883	2413	
35	80:20	3204	1824	0	4195	2692	2617	9262	3019	6449	2351	1387	1221	1833	2165	
50	100	3415	1362	3970	3931	7787	9918	458	10080	9847	2337	1653	1572	1597	1410	
50	90:10	6089	1417	3229	2262	5833	4205	3085	3470	14461	2306	1103	1296	1422	1405	
50	80:20	2198	1824	3166	3442	3395	3206	438	4296	4070	2406	1183	2063	1494	2016	

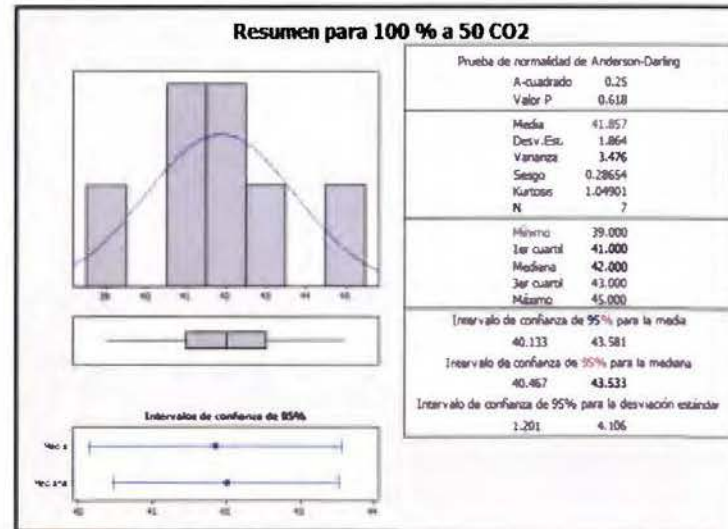
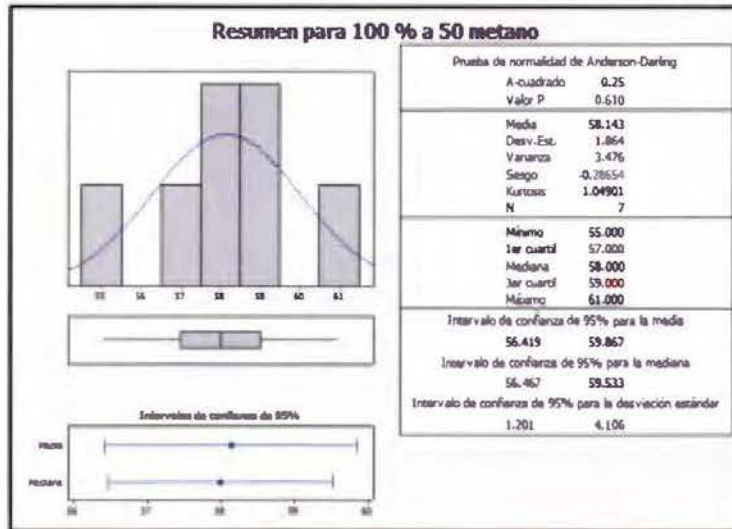
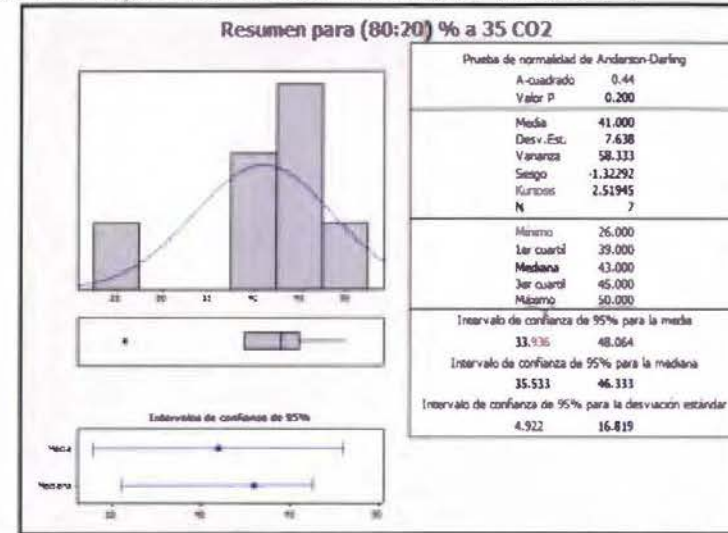
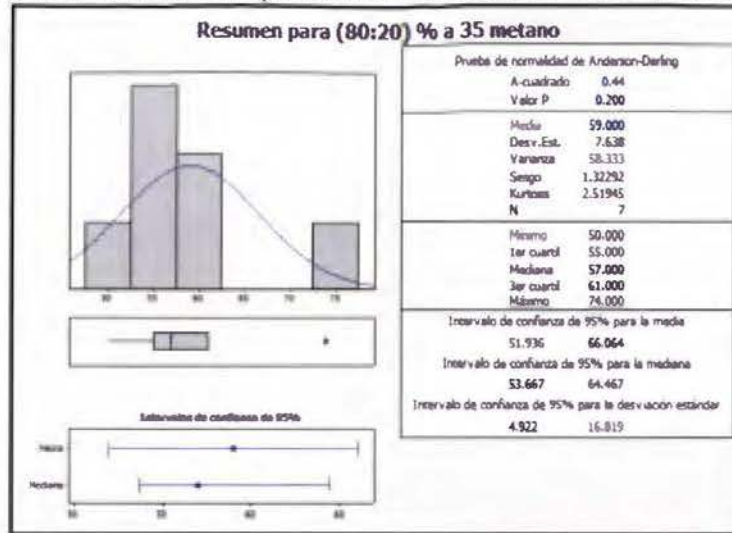
		Acido propanoico (mg/L)														
Temperatura de operación (°C)	Día	4	5	9	11	28	36	42	50	58	66	74	80	88	101	
	Composición de sustrato															
35	100	793	609	ND	1155	4941	13629	110	8386	1119	1240	282	602	1414	847	
35	90:10	1297	727	ND	1439	1827	2806	279	3457	4158	1737	556	1298	676	574	
35	80:20	167	670	ND	1145	2867	2010	2090	5075	2713	1353	573	1537	1175	1840	
50	100	1568	609	530	925	1224	1880	0	0	2891	1125	426	518	958	196	
50	90:10	272	727	379	832	1992	1290	139	1088	3275	914	312	ND	184	356	
50	80:20	182	670	416	903	1109	1121	0	1768	1957	1197	336	ND	373	746	

		Acido butirico (mg/L)														
Temperatura de operación (°C)	Día	4	5	9	11	28	36	42	50	58	66	74	80	88	101	
	Composición de sustrato															
35	100	479	332	0	863	1569	5855	0	0	417	0	0	0	0	0	
35	90:10	1356	492	0	1056	693	2152	0	0	1007	0	0	0	0	0	
35	80:20	0	362	0	869	620	1523	0	0	1419	0	0	0	0	0	
50	100	1369	332	565	1078	2291	1512	0	0	1701	0	0	0	0	0	
50	90:10	953	492	698	1120	2048	6079	0	0	2919	0	0	0	0	0	
50	80:20	3295	362	1122	2539	993	8317	0	0	1081	0	0	0	0	0	

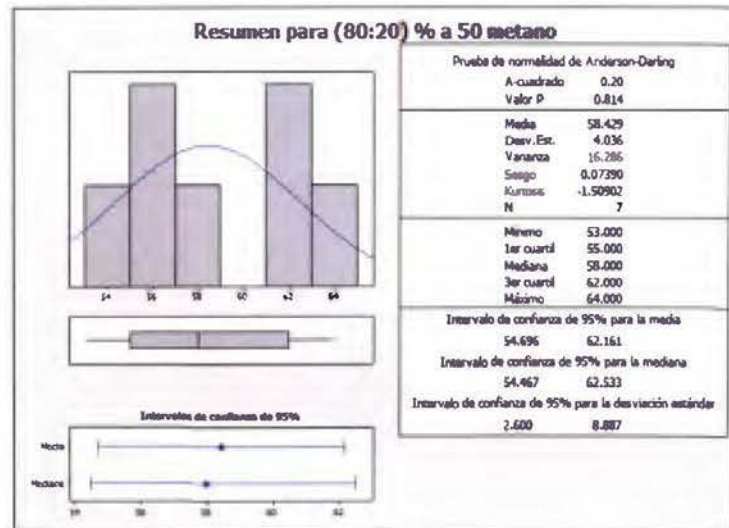
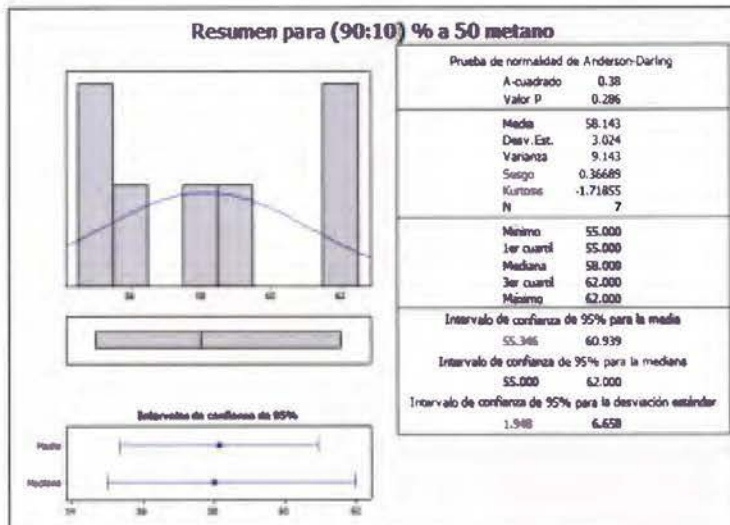
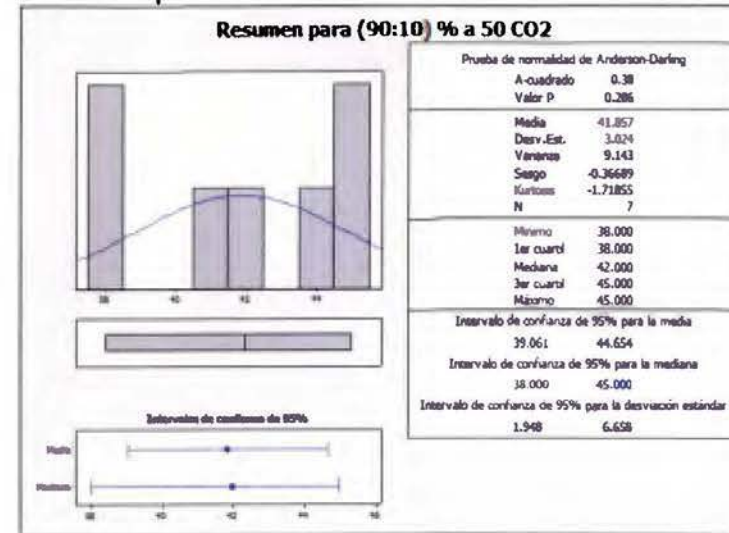
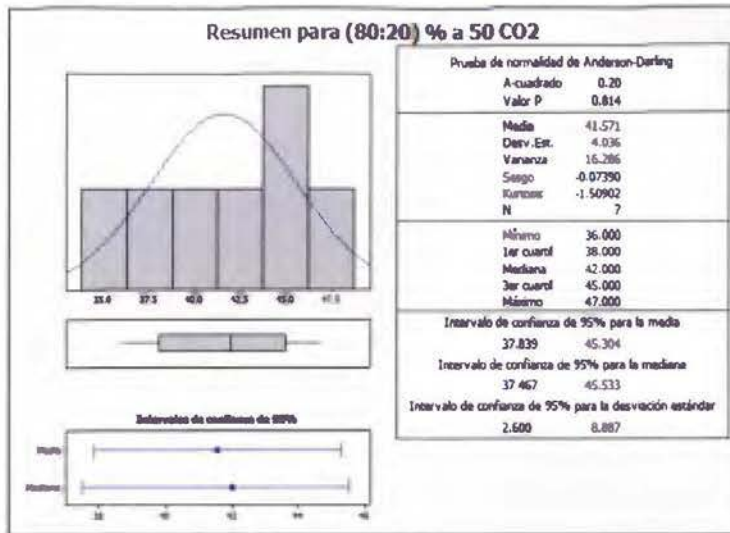
ANEXO 4. Distribución de probabilidad de los datos de % de CH₄ y % CO₂ de los diferentes experimentos entre la semana 9 hasta la 15.



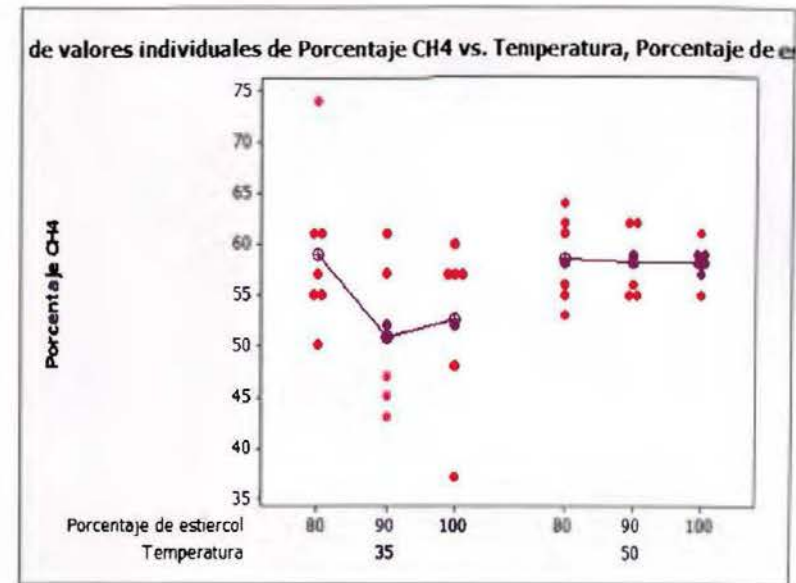
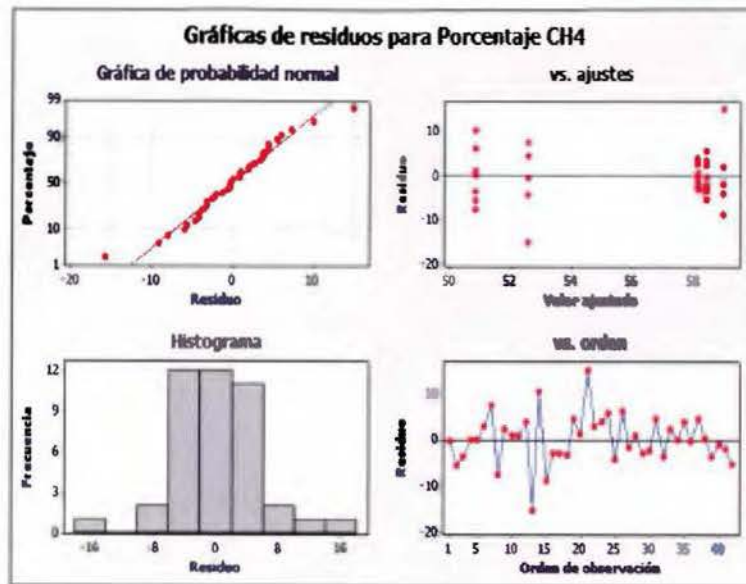
ANEXO 4. Distribución de probabilidad de los datos de % de CH₄ y CO₂ de los diferentes experimentos entre la semana 9 hasta la 15.



ANEXO 4. Distribución de probabilidad de los datos de % de CH₄ y CO₂ de los diferentes experimentos entre la semana 9 hasta la 15.



ANEXO 5. Gráficos de residuales y de distribución de los datos por temperatura y composición de sustrato para el análisis de las diferencias en el % de CH₄



ANEXO 6. Estructuras químicas del glucano, xilano y lignina

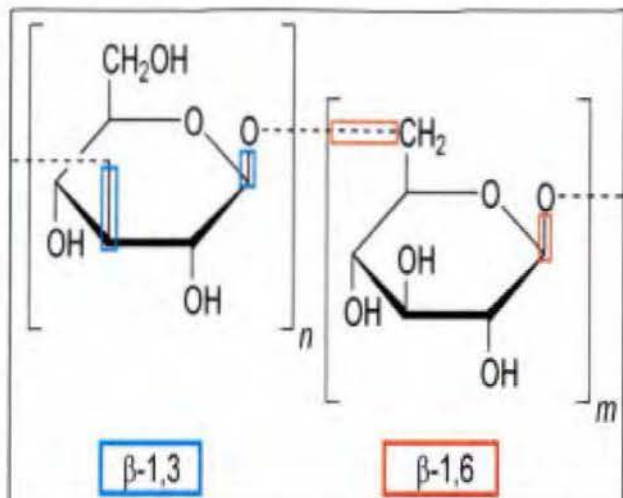


Figura 30. Estructura molecular del glucano.

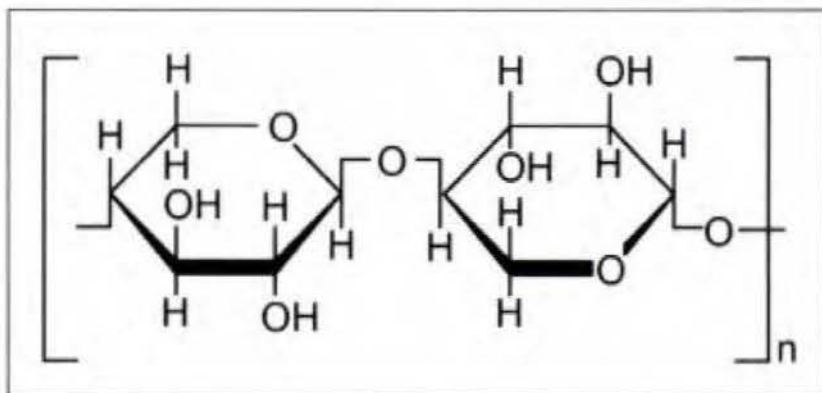


Figura 31. Estructura del xilano.

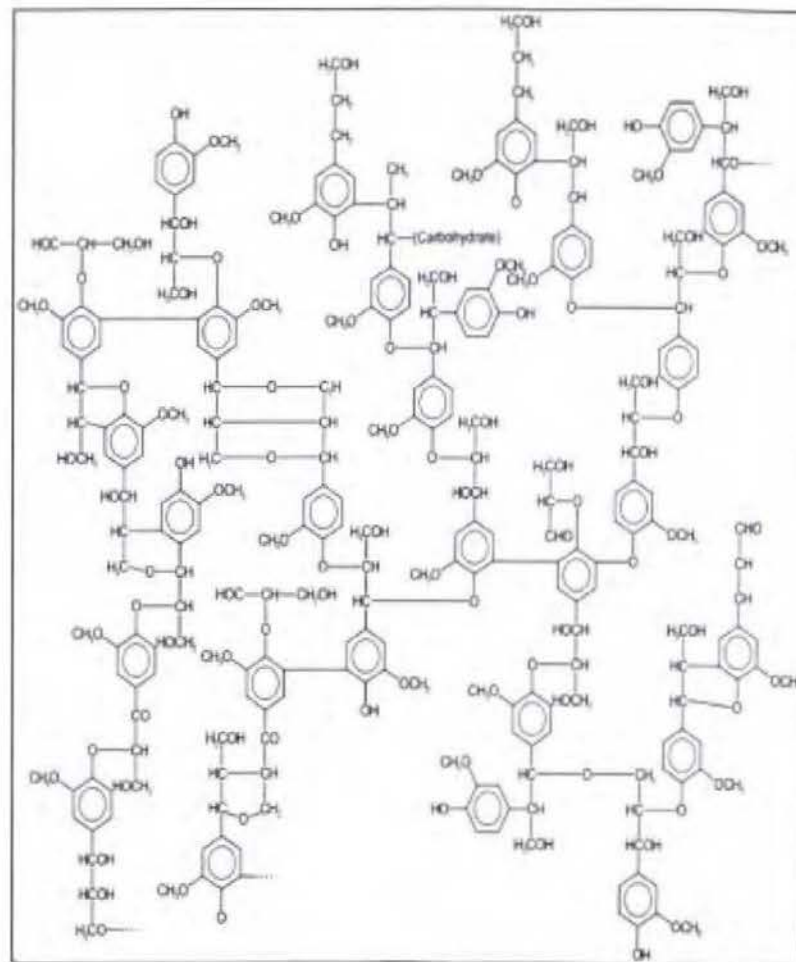
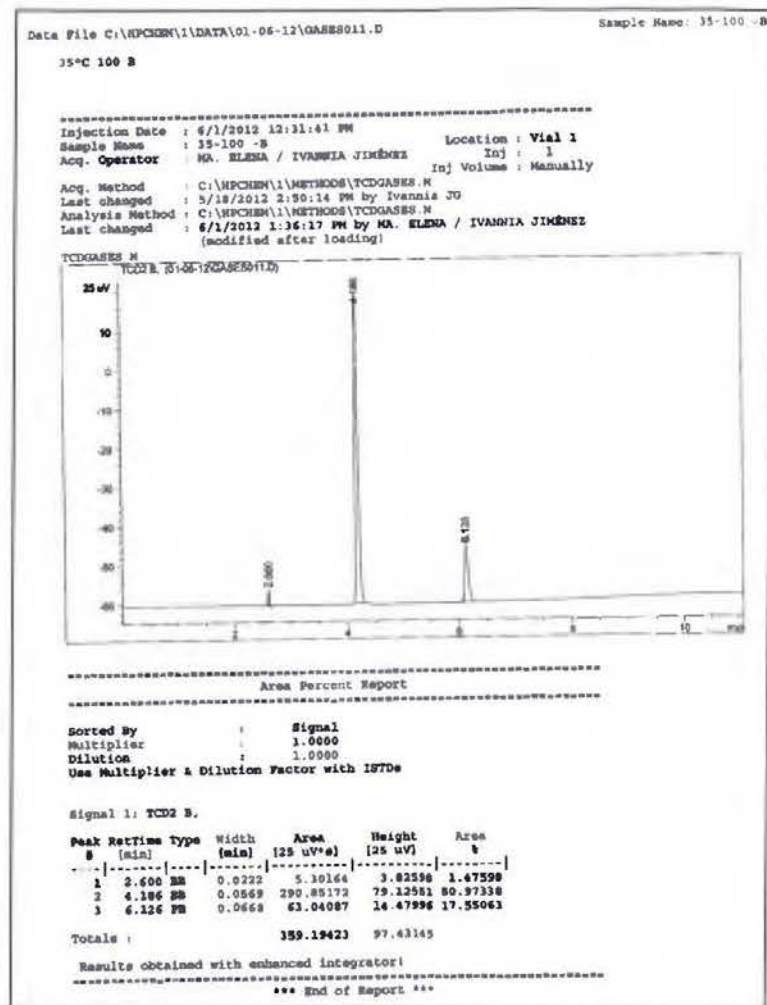
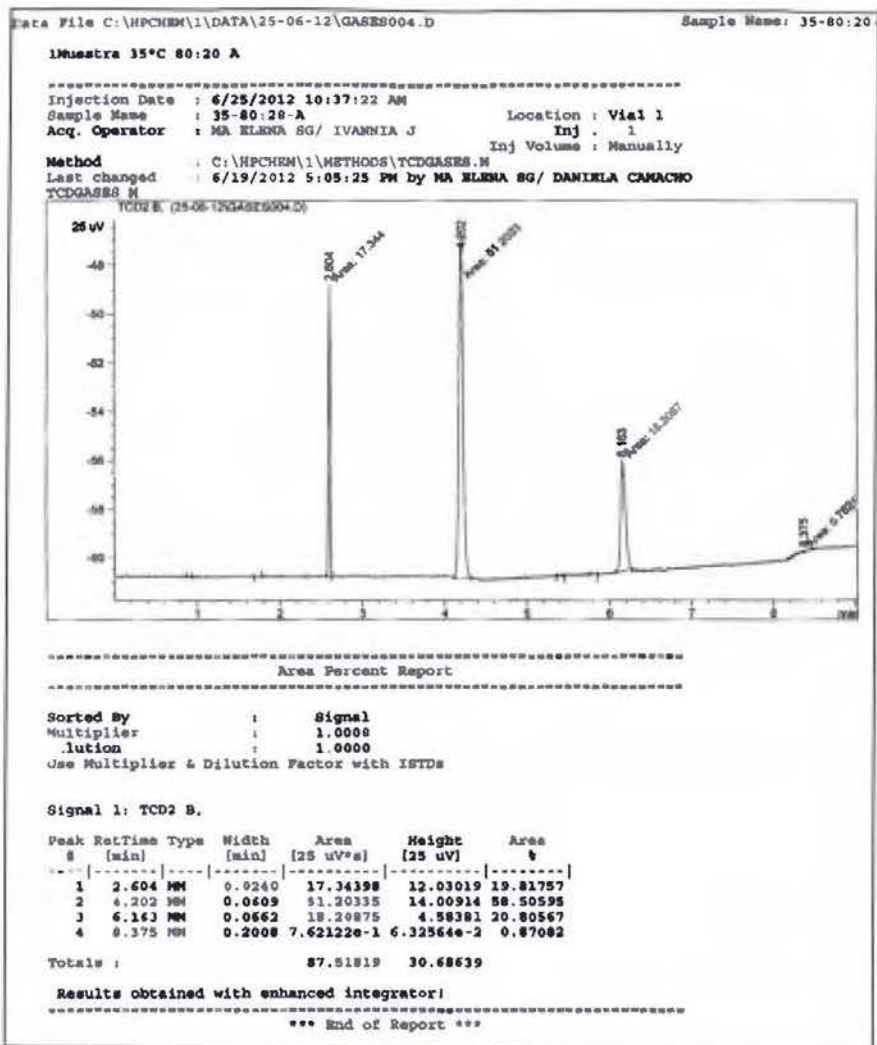
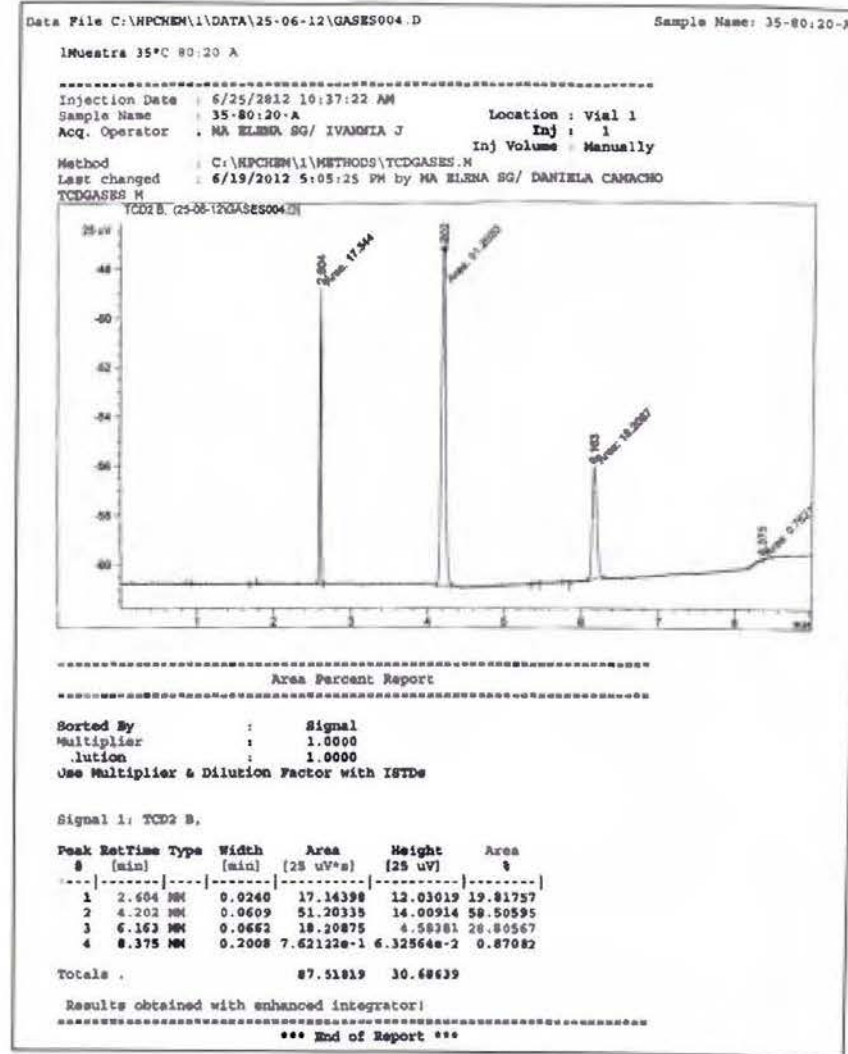
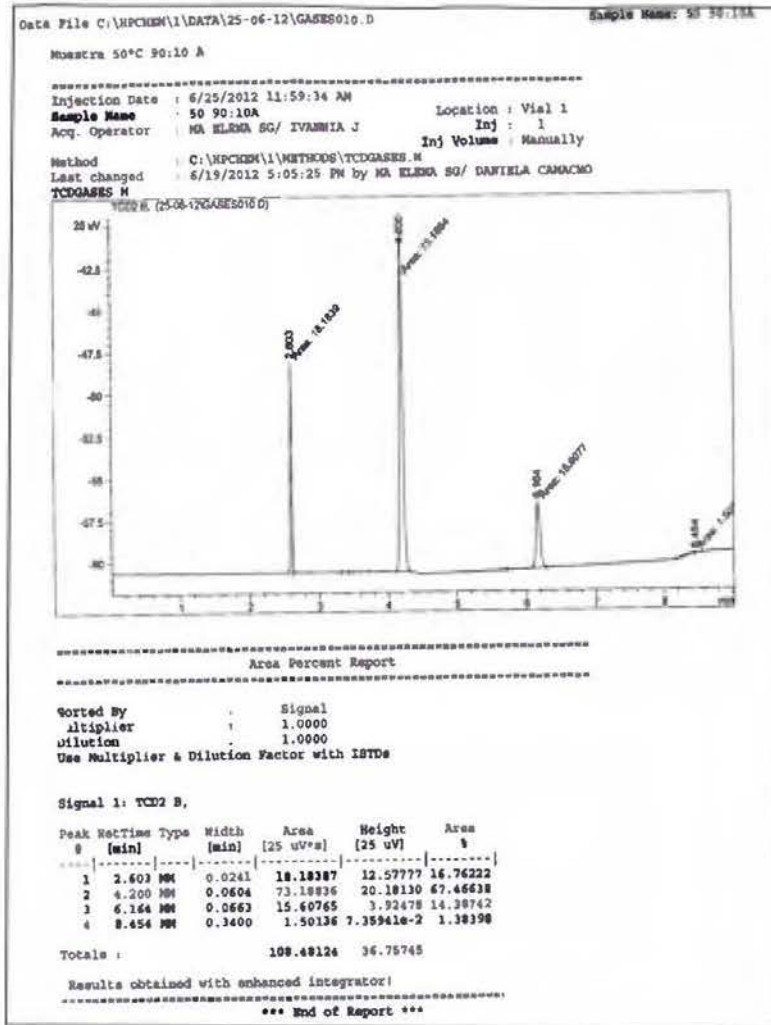


Figura 32. Estructura de la lignina.

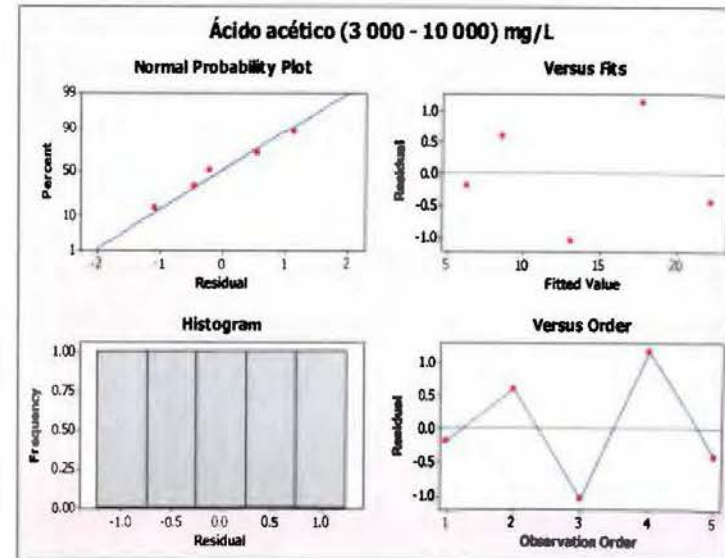
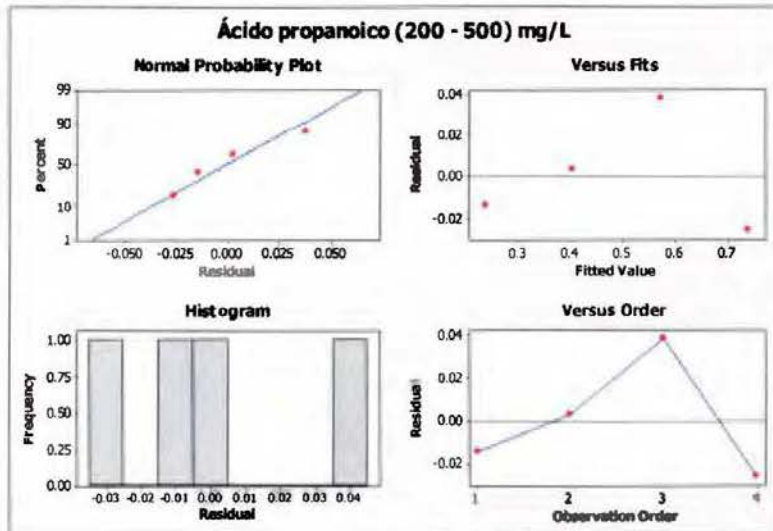
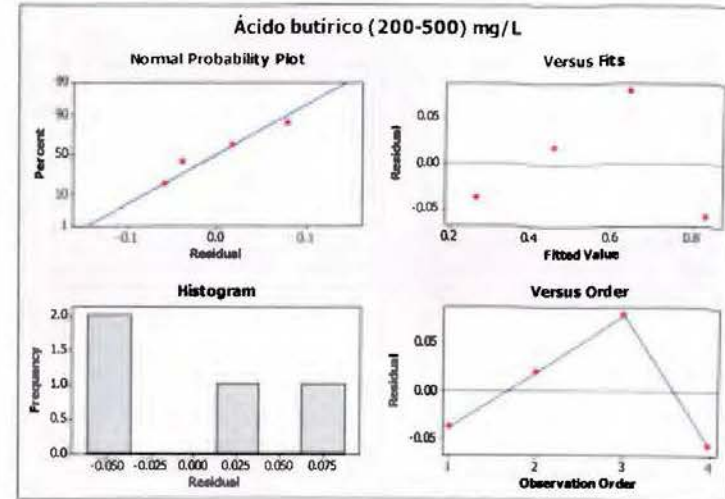
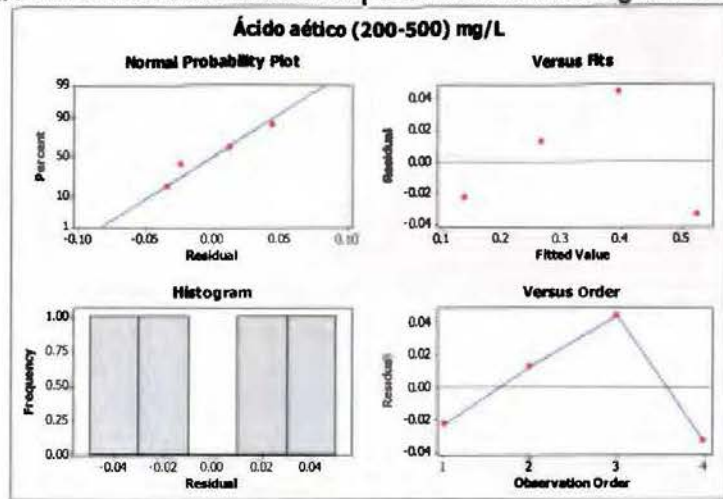
ANEXO 7. Cromatogramas de las muestras de biogás analizadas.



ANEXO 7. Cromatogramas de las muestras de biogás analizadas.



ANEXO 8. Gráficos de residuales para las curvas de regresión lineal.



ANEXO 8. Gráficos de residuales para las curvas de regresión lineal.

