

## DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, GLICERINA LIBRE Y GLICERINA TOTAL EN BIODIÉSEL

*Paola Fuentes Schweizer y Anayansi Wong Monge\**

Centro de Electroquímica y Energía Química (CELEQ). Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

*Recibido octubre 2015; aceptado diciembre 2015*

### **Abstract**

The validation of two analytical methods by gas chromatography was performed, in order to evaluate the quality of biodiesel (B100) and its usefulness as fuel. The performed methods were: determination of total content of fatty acid methyl esters (FAME) and determination of free and total glycerol content. Standards IN 14103: 2011 and ASTM D6584-13 were used as reference respectively. The performance parameters evaluated and documented for the two methods in the study were: linearity, detection limit and quantification limit, precision by repeatability and intermediate repeatability, trueness through a recovery test. Based on the evaluation of performance parameters and acceptance criteria it was concluded that the two methods are statistically and analytically under control; also both methods allow to establish a continuous assessment; demonstrating that the analytical procedures used are suitable for use as a routine screening test at CELEQ.

### **Resumen**

Se realizó la validación de dos métodos analíticos por cromatografía de gases, con el objetivo de evaluar la calidad del biodiésel (B100) para ser utilizado como combustible. Los métodos corresponden a la determinación del contenido total de metil ésteres de ácidos grasos (FAME) y la determinación de glicerina libre y glicerina total. Se utilizaron como referencia la Norma EN 14103:2011 y la Norma ASTM D6584-13 respectivamente. La linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, precisión por medio de repetibilidad y repetibilidad intermedia, además de la veracidad a través de un ensayo de recuperación se evaluaron para los dos métodos. Con base en la evaluación de los parámetros de desempeño y los criterios de aceptación establecidos, se concluyó que los dos métodos en estudio se encuentran bajo control estadístico y analítico. Además, se puede establecer una evaluación constante, la cual demuestra que los procedimientos analíticos son adecuados para su uso como una prueba de análisis de rutina en el CELEQ.

**Key words:** Biodiesel, fatty acid methyl esters (FAME), free and total glycerin, gas chromatography.

**Palabras clave:** Biodiésel, metil ésteres de ácidos grasos, glicerina libre y total, cromatografía de gases.

## **I. INTRODUCCIÓN**

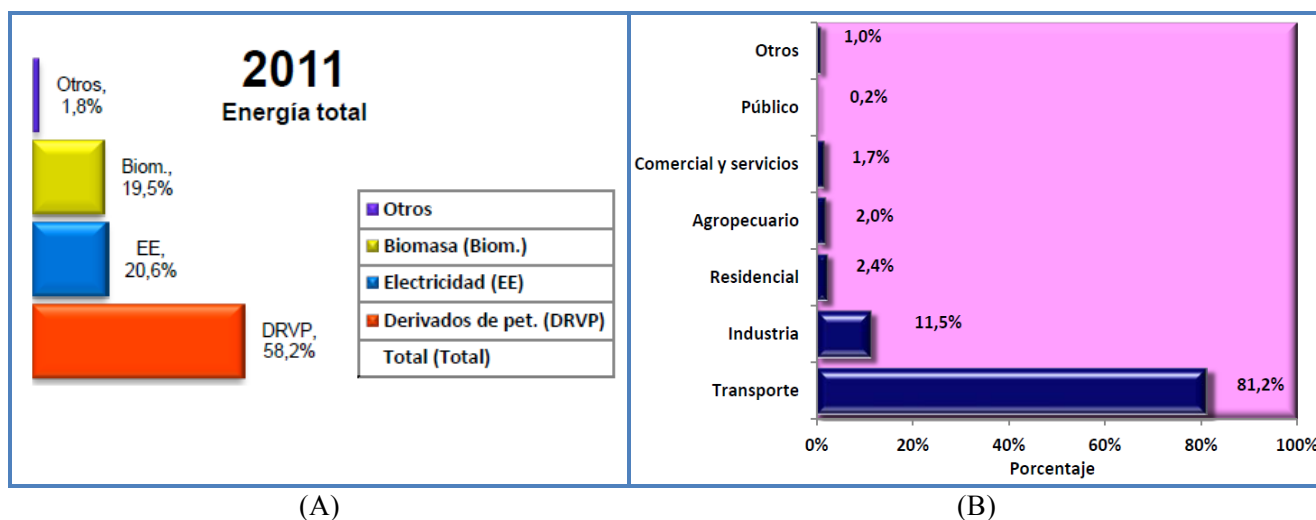
A nivel internacional, Costa Rica es considerada uno de los países con mejor desempeño energético debido a que su energía primaria (energía sin transformar proveniente de fuentes naturales) es suministrada por las siguientes fuentes: energía geotérmica, la hidroenergía y la leña.

---

\* Autor para correspondencia: [paola.fuentes@ucr.ac.cr](mailto:paola.fuentes@ucr.ac.cr)

La energía secundaria corresponde a aquellos productos energéticos que han sufrido una transformación física o química y en este país se ubican en esta categoría al carbón vegetal, el alcohol, los derivados del petróleo y la electricidad [12].

El consumo total corresponde a la cantidad de energía que fue utilizada proveniente de la suma de la energía primaria y secundaria. Según el Balance Energético Nacional del 2011 del Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE), el consumo final total de energía según fuente de generación es de 58,2 % para los derivados de petróleo, siendo el sector transporte el principal consumidor de esta energía según los gráficos mostrados en la Figura 1.



**FIGURA 1.** (A) Estructura del consumo final total de energía por fuente de generación, Costa Rica  
(B) Distribución del consumo de derivados de petróleo por sectores en Costa Rica, 2011 [12].

Por lo anterior, para el Foro Económico Mundial (WEF, por sus siglas en inglés), “Costa Rica presenta una debilidad en el consumo de combustibles fósiles y en las emisiones del sector de transporte público, aspectos que debe mejorar para lograr el objetivo de ser un país carbono neutral” [5]. El país tiene una alta demanda en el uso de hidrocarburos, con un alto encarecimiento y elevada dependencia de esta fuente energética, sobre todo en el sector transporte, y la investigación en el tema de biocombustibles al servicio de los productores nacionales resulta una necesidad. Dichos biocombustibles deben ser diseñados para cumplir dos objetivos primordiales: disminuir el impacto ambiental y no afectar la vida útil de los equipos y las maquinarias en los que van a ser utilizados.

El presente trabajo de investigación se enfoca en la evaluación de la calidad del biodiésel para ser utilizado o comercializado como combustible. La American Society of Testing Materials (ASTM) define biodiésel como combustible formado por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de aceites vegetales o grasas animales [3]. El biodiésel se obtiene por una reacción de transesterificación de tres etapas, como es posible apreciar en la Figura 2.

Costa Rica regula la calidad del biodiésel con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 75.02.43:07) [13] que especifica las características físicas y químicas al 100 % en volumen (B100), de tal modo que para la determinación del contenido total de los metil ésteres de ácidos grasos se establece un mínimo de 96,5 % en masa, con base en la norma EN 14103 como referencia. El método permite verificar que el contenido de FAME es superior al 90 % en masa; por lo tanto resulta adecuado para los ésteres metílicos con cadenas de carbono comprendidas entre C14:0 y C24:1. En este estudio se determinan los componentes principales del biodiésel (FAME) por medio de la norma EN 14103, mientras que aquellos componentes que se consideran impurezas o

compuestos que pueden repercutir en el rendimiento del biodiésel son cuantificadas mediante la norma ASTM D6584.

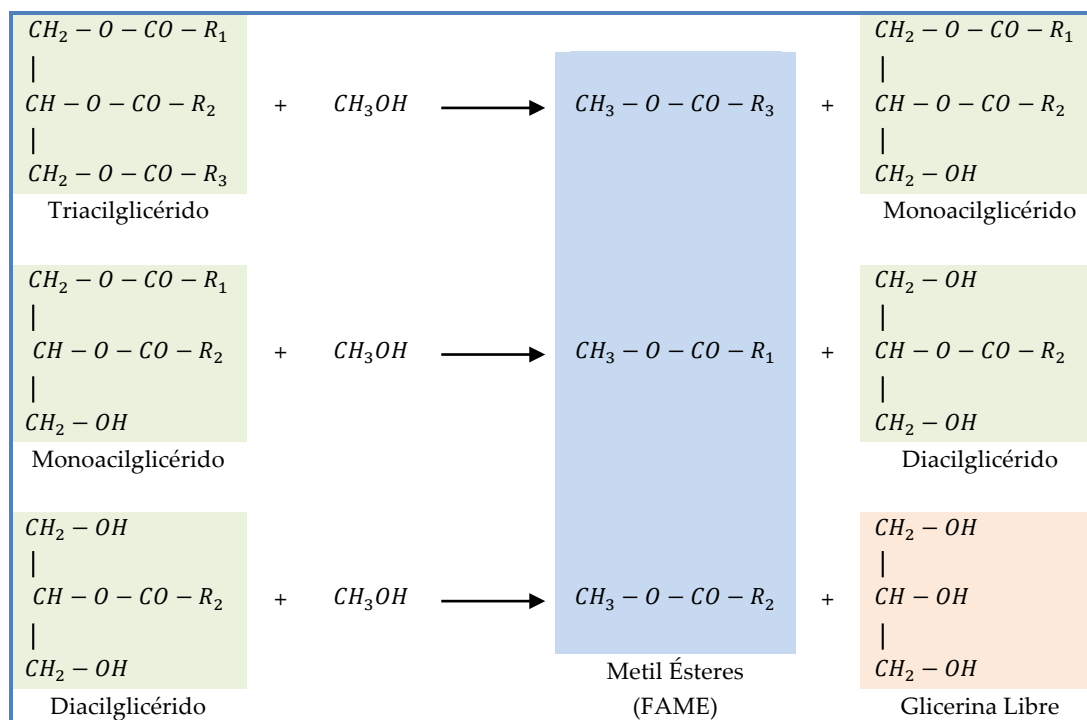


FIGURA 2. Reacción de transesterificación del biodiésel.

El parámetro de glicerina libre está relacionado con la cantidad de glicerina como un producto remanente de la reacción de transesterificación, que debe separarse del B100, pues su presencia puede formar depósitos en el fondo de los tanques de almacenaje de combustible y puede obstruir el filtro respectivo. También, puede ocurrir que este material se deposite en los inyectores [8].

La glicerina ligada es la glicerina unida a las moléculas de los mono-, di- y triacilglicéridos, que corresponde a la materia prima no transformada o parcialmente reaccionada (aceite vegetal, aceite de cocina residual o grasa animal). La presencia de estos compuestos pueden causar un desgaste en el inyector de combustible y depósitos en los cilindros en motores diésel, reduciendo la vida del motor [8]. La glicerina total corresponde a la suma de glicerina libre más la glicerina ligada. El RTCA para combustibles establece que para la glicerina libre se permite un máximo de 0,020 % en masa y para la glicerina total un máximo de 0,240 % en masa, según una recomendación de la norma ASTM D6584 [12].

Robles [14] realizó un trabajo similar en la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, sin embargo éste se encontraba enfocado más en la glicerina que en el biodiésel y corresponde a una adaptación de la norma ASTM D6584.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Determinación del Contenido Total de FAME

**Equipos.** Cromatógrafo de gases marca HP 6890 serie II. Columna capilar marca Supelco (EQUITY-1) de sílice fundida, de 30 m de longitud, con un diámetro interno de 0,25 mm y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película, con una fase estacionaria de poli(dimetil siloxano), que funciona con una temperatura máxima de 350 °C, con un inyector split/splitless y un detector de ionización de llama FID. Las condiciones cromatográficas que se utilizaron se despliegan en el Cuadro 1.

**CUADRO 1.** Condiciones cromatográficas para la determinación del contenido total de FAME

Variables	Valores
<b>1. Inyector</b>	
- Tipo:	Split con relación 100:1
- Tamaño de la muestra:	1,0 $\mu\text{l}$
- Temperatura:	250 °C
- Presión:	15,6 psi
- Flujo:	124 ml/min
<b>2. Programa de Temperatura en la Columna</b>	
- Temperatura inicial:	100 °C,
- Rampa 1:	15 °C/min hasta 200 °C
- Rampa 2:	5 °C/min hasta 300 °C
<b>3. Detector</b>	
- Tipo:	Ionización de llama (FID)
- Temperatura:	300
<b>4. Gas Transportador</b>	
- Tipo:	Nitrógeno
- Velocidad de flujo:	1,2 ml/min

**Reactivos.** Los estándares de calibración que se utilizaron (marca Supelco): metil tetradecanoato (C14:0), metil palmitato (C16:0), metil heptadecanoato (C17:0), metil octadecanoato (C18:0), metil araquidato (C20:0), metil lignocerato (C24:0), mezcla de ésteres métilicos de C4 a C24 y n-heptano (calidad reactivo).

**Preparación de Muestras de Análisis.** Se pesó 100 mg de la muestra, se introdujo en un vial de 10 ml y a continuación se añadió 2,0 ml de la disolución de heptadecanoato metílico (estándar interno) y 3,0 ml de n-heptano (disolvente) utilizando una pipeta. Previamente, las muestras de biodiésel se les revisó visualmente para corroborar que se encontraban homogéneas, es decir libres de sustancias precipitadas, o de geles que formen una suspensión. Las muestras se filtraron a través de lana de vidrio en caso necesario.

### Determinación de la Glicerina Libre y Glicerina Total

**Equipo.** Cromatógrafo de gases marca HP 6890 serie II. Columna capilar marca Agilent, modelo BD ASTM D6584, de 15 m de longitud con un diámetro interno de 0,32 mm y 0,1  $\mu\text{m}$  de espesor de película, que funciona a altas temperaturas (hasta 400 °C), con un inyector "cool on column".

Se siguieron las condiciones cromatográficas establecidas en la Norma ASTM D6584 [3], con la modificación de que se utiliza nitrógeno como gas de arrastre.

**Reactivos.** Se siguieron los lineamientos establecidos en la Norma ASTM D6584 [3].

**Preparación de Muestras de Análisis.** Se pesó 100 mg de muestra, se introdujo en un vial de 10 ml y se añadió 100 µl de butanotriol y 100 µl de tricaprín (estándares internos), se adicionó 100 µl de MSTFA, el vial se cerró, se agitó vigorosamente por 3 min y se dejó en reposo de 15 a 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 8 ml de heptano y se homogenizó la disolución por agitación.

Los proveedores locales estudiados presentaron un exceso de di- y triacilglicéridos, por lo que se decidió hacer una dilución: se tomó una muestra de biodiésel de 250 mg en balones de 25 ml que se aforó con heptano. De la disolución anterior, se puede variar la alícuota a tomar dependiendo de la concentración presente; para el caso en estudio se utilizó una de 300 µl.

## Parámetros de Desempeño

**Linealidad.** Para la evaluación de la linealidad se prepararon cinco disoluciones patrón y posteriormente, en hojas de cálculo se graficaron los valores obtenidos para calcular una recta de calibración para cada analito (relación de áreas vs relación de masas), con sus respectivos coeficientes de correlación. El procedimiento anterior se realizó por triplicado.

Para evaluar que no existe diferencia significativa entre las medias se realizó una prueba estadística  $F_{ANOVA}$  por medio del programa Excel con un nivel de confianza del 95 %. Para evaluar que las varianzas de la población en estudio son iguales se aplicó la prueba de Levene por medio del programa Minitab 17, tomando como valor crítico  $p = 0,05$ . Se aplicó esta prueba según resultados previos de Robles, donde los datos siguen distribuciones continuas [14].

**Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).** Los límites de detección y de cuantificación se calcularon por el método de regresión de mínimos cuadrados según el programa SMAC [9], a un nivel de confianza del 95%. Al haberse realizado tres curvas de calibración para cada patrón, en diferentes días se obtuvo tres diferentes LD y LC, de tal modo que se escogió el de mayor valor.

**Precisión.** La precisión se evaluó por una prueba de repetibilidad y de repetibilidad intermedia. La repetibilidad es la variación que se da en los resultados obtenidos por un solo analista en un único equipo, el mismo día de la medición. El analista preparó siete réplicas, del patrón 1 (nivel bajo), del patrón 3 (nivel medio) y del patrón 5 (nivel alto).

La repetibilidad intermedia es la variación que se da en los resultados obtenidos al mantener los parámetros del método constantes pero se varía una condición. Para este ensayo se cambió el analista, de tal modo que esta persona preparó siete réplicas en un mismo día del patrón 1 (nivel bajo) y del patrón 5 (nivel alto).

Tanto la repetibilidad como la repetibilidad intermedia se reportó por comparación entre el porcentaje del coeficiente de variación obtenido con respecto al porcentaje recomendado por el criterio de Horwitz [10].

**Veracidad.** Al no contar con una muestra de biodiésel certificada, se aplicó el método de recuperación para evaluar la veracidad. Lo primero que se realizó es un análisis de siete réplicas de la muestra inicial; posteriormente se realizaron las fortificaciones por triplicado a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto). Los porcentajes de recuperación se calcularon aplicando la ecuación 1 [7]:

$$\% R = \left( \frac{C_{fortificación} - C_{inicial}}{C_{teórica\ adicionada}} \right) * 100\% \quad (1)$$

Donde:

R: Porcentaje de Recuperación, %

C: Concentración,  $\text{mg}^{-1}$

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación del Contenido Total de FAME

A partir de un patrón con la mezcla de los compuestos con cadenas de carbono de C4 a C24 se obtuvo el cromatograma que se observa en la Figura 3, en el cual cada pico se encuentra señalado con un número que corresponde a un éster metílico que se puede ubicar en el Cuadro 2. Los picos cuyos números no se encuentran encerrados entre paréntesis corresponden a los metil ésteres identificados pues se cuenta con sus materiales de referencia. Los otros picos se reconocen de acuerdo a su orden de aparición, con base en el cromatograma de referencia del proveedor de la columna [16].

La norma ISO 5508 en el apartado 4.1.4.2 señala que: “Si en la fase estacionaria se utilizan los polisiloxanos polares pueden crear dificultades en la identificación y la separación del ácido linolénico y de los ácidos con cadenas de carbono de C20” [1]. Lo anterior, se puede percibir en las zonas ampliadas de la Figura 3, de tal modo que no se pueden identificar estos compuestos independientemente. No obstante, en las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano se solicita únicamente la cuantificación del porcentaje total de ésteres metílicos.

**Linealidad.** Se obtienen las curvas de calibración que se pueden observar en la Figura 4. Al llevar a cabo el análisis de la desviación estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen, es posible definir los límites de confianza al 95% para dichas variables, de tal modo que las curvas de calibración se pueden expresar como en el Cuadro 3.

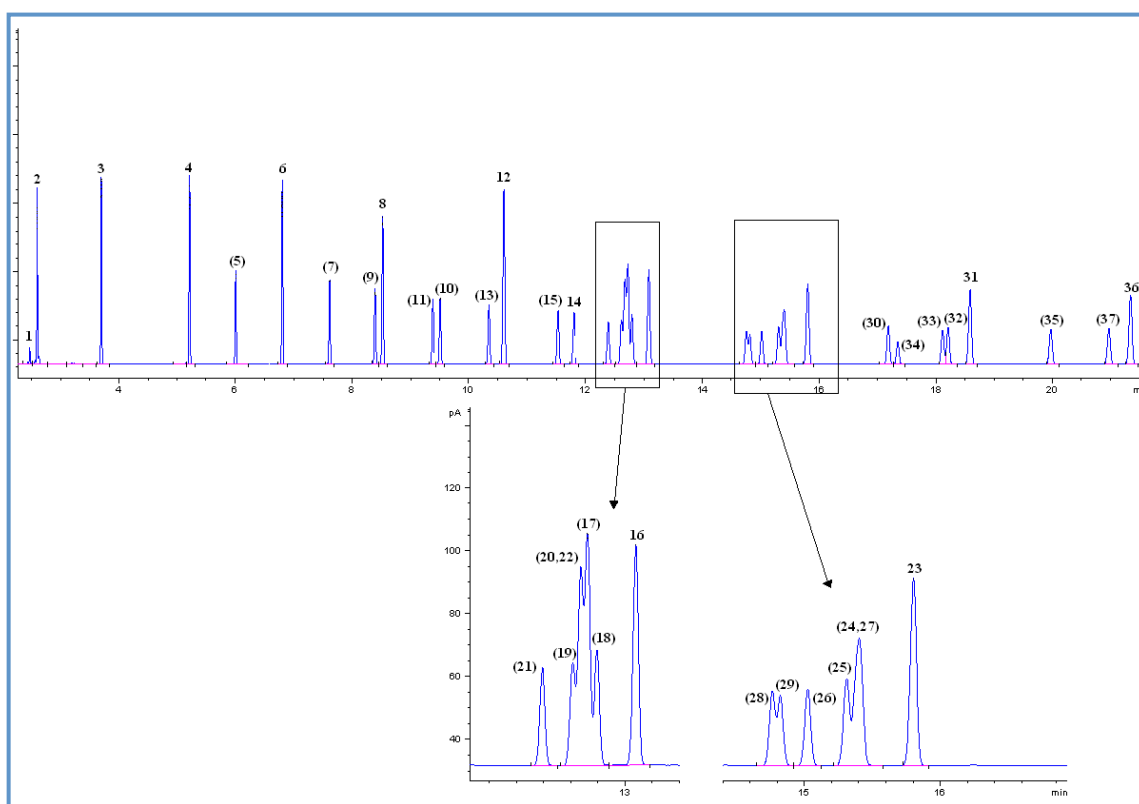


FIGURA 3. Cromatograma experimental de los 37 picos de la mezcla de compuestos con cadenas de carbono de C4 a C24 según las condiciones descritas en el Cuadro 1.

A los resultados del total del contenido de FAME en patrones, se les realiza un gráfico de residuales con los datos ajustados a la curva de calibración anterior, en el cual se describe un comportamiento homocedástico. Por tanto, la concentración de las muestras no influye en la variabilidad de las mediciones. Además, se puede utilizar el análisis por mínimos cuadrados no ponderados para el cálculo de límites de detección y de cuantificación, sin incurrir en un error significativo en el resultado.

Se realizó una prueba estadística  $F_{ANOVA}$ , cuyos resultados se muestran en el Cuadro 4 con un nivel de confianza del 95%. Se rechazó la hipótesis nula de que no existe diferencia significativa entre las medias para el contenido total de FAME en los patrones.

Al aplicar la prueba de Levene y según los resultados del Cuadro 4 se aceptó la hipótesis nula de que todas las varianzas de la población en estudio son iguales.

Con base en los resultados, se puede afirmar que existe homogeneidad de las varianzas para los datos experimentales estudiados. En otras palabras, aún cuando los valores de error estadístico difieren entre sí, se trata de un efecto aleatorio, por lo tanto existe la probabilidad de que las fuentes de variación sean las mismas.

**CUADRO 2.** Identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que se aprecian en la Figura 3

No.	Éster Metílico de Ácido	Tiempo Retención (min)	No.	Éster Metílico de Ácido	Tiempo Retención (min)
(1)	Butírico (C4:0)	2,472	(20)	Linoleaídico (C18:2n6t)	-
2	Caprónico (C6:0)	2,596	(21)	$\gamma$ -linolénico (C18:3n6)	12,388
3	Caprílico (C8:0)	3,700	(22)	$\alpha$ -linolénico (C18:3n3)	-
4	Cáprico (C10:0)	5,211	23	Araquídico (C20:0)	15,800
(5)	Undecanóico (C11:0)	6,009	(24)	cis-11-eicosenóico (C20:1n9)	15,398
6	Láurico (C12:0)	6,800	(25)	cis-11, 14-eicosenóico (C20:2)	-
(7)	Tridecanóico (C13:0)	7,619	(26)	cis-8, 11, 14-eicosenóico (C20:3n6)	15,021
8	Mirístico (C14:0)	8,517	(27)	cis-11, 14, 17-eicosenóico (C20:3n3)	-
(9)	Miristoléico (C14:1)	8,368	(28)	Araquidónico (C20:4n6)	14,764
(10)	Pentadecanóico (C15:0)	9,506	(29)	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentanóico (C20:5n3)	-
(11)	cis-10-pentadecanóico (C15:1)	9,368	(30)	Heneicosanóico (C21:0)	17,198
12	Palmítico (C16:0)	10,604	31	Behénico (C22:0)	18,600
(13)	Palmitoléico (C16:1)	10,350	(32)	Eúrico (C22:1n9)	18,211
14	Heptadecanóico (C17:0)	11,794	(33)	Cis-13,16-docoseinóico (C22:2)	18,118
(15)	cis-10-heptadecanóico (C17:1)	11,521	(34)	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexanóico (C22:6n3)	17,359
16	Esteárico (C18:0)	13,076	(35)	Tricosanóico (C23:0)	19,984
(17)	Oléico (C18:1n9c)	12,716	36	Lignocérico (C24:0)	21,353
(18)	Eláidico (C18:1n9t)	-	(37)	Nervónico (C24:1n9)	20,985
(19)	Linoléico (C18:2n6c)	-			

**CUADRO 3.** Curva de calibración con su coeficiente de correlación

Curva de Calibración	Coefficiente de Correlación, $r^2$
$A_{tot}/A_{SI} = (1,13 \pm 0,05) m_{tot}/m_{SI} + (0,00 \pm 0,13)$	0,9994

Donde:

$A_{tot}$ : Área del contenido total de FAME, pA\*s

$A_{SI}$ : Área total del estándar interno, pA\*s

$m_{tot}$ : Masa total de la muestra, mg

$m_{SI}$ : Masa del estándar interno, mg

**CUADRO 4.** Análisis estadístico de las pruebas  $F_{ANOVA}$  y Levene

	Prueba $F_{ANOVA}$		Prueba Levene	
	$F_{exp}$	$F_{tab}$	$p_{exp}$	$p_{tab}$
Contenido total de FAME	349,6	3,478	0,586	0,05

### Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).

**CUADRO 5.** Límite de detección y cuantificación para la determinación del contenido total de FAME en patrones por cromatografía de gases

	Límite de Detección, LD (mg/mg)	Límite de Cuantificación, LC (mg/mg)
Contenido total de FAME	0,21	0,41

**Precisión.** La repetibilidad se evalúa para los dos analistas participantes. Los resultados se distinguen en el Cuadro 6, mientras que los resultados de repetibilidad intermedia se aprecian en el Cuadro 7.

**CUADRO 6.** Análisis de la repetibilidad de los analistas 1 y 2 para tres niveles de concentración del contenido total de FAME en patrones

	Contenido Total 1, C (% masa)			Contenido Total 2, C (% masa)	
	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto	Nivel Medio	Nivel Alto
Promedio, C	117,2	112,7	105,4	110,3	108,1
Desviación estándar, s	0,89	1,40	1,03	0,75	0,73
Coefficiente de variación, CV	0,76	1,24	0,98	0,68	0,68

**CUADRO 7.** Análisis de repetibilidad intermedia para el contenido total de FAME en patrones

Variables	Nivel Medio	Nivel Alto
Analista 1, C (% masa)	112,71	105,37
Analista 2, C (% masa)	110,33	108,10
Contenido Promedio, C (% masa)	111,52	106,73
Desv. Estándar Ponderada, s (%masa)	1,12	0,89
Coefficiente Variación, CV (%)	1,01	0,84



En la información de los cuadros anteriores se aprecia que el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) para el contenido total de FAME en los diferentes niveles de concentración para ambos analistas se mantiene por debajo del valor crítico de 2 %, según el criterio de aceptación para la repetibilidad por la trompeta de Horwitz [10].

**Veracidad.** Se trabaja con muestras de un productor local de biodiésel A, en la Figura A1 se presenta el cromatograma de la muestra inicial, el cual sintetiza el aceite reciclado como materia prima.

Las curvas que se obtienen para la evaluación de la recuperación del contenido total de FAME se describen en la Figura 4 y los porcentajes de recuperación se señalan en el Cuadro 8.

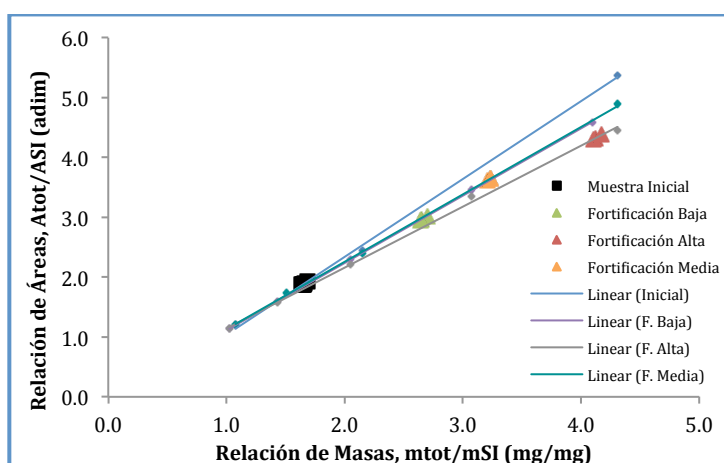


FIGURA 4. Gráficos para la evaluación de la recuperación a tres niveles de concentración

CUADRO 8. Porcentajes de recuperación del contenido total de FAME para una muestra de biodiésel A

	Concentración Inicial $\left(\frac{\text{Rel. Masas}}{\text{Masa Muestra}}\right)$	Concentración Fortificada $\left(\frac{\text{Rel. Masas}}{\text{Masa Muestra}}\right)$	Concentración Teórica $\left(\frac{\text{Rel. Masas}}{\text{Masa Muestra}}\right)$	Porcentaje de Recuperación (%)
Fortificación Baja	0,0159	0,0260	0,0102	99,37
Fortificación Media	0,0168	0,0320	0,0150	101,94
Fortificación Alta	0,0175	0,0404	0,0211	108,66

Los porcentajes de recuperación se mantienen dentro del criterio de aceptación establecido de 90 a 110 %.

### Determinación de la Glicerina Libre y Glicerina Total

Los resultados experimentales se obtienen a partir de los cromatogramas y sus respectivos reportes de integración, de los cuales se integran las áreas de los picos de interés (glicerina, butanotriol, monooleína, tricaprín, dioleína y trioleína), como se pueden apreciar en el cromatograma de la figura A2.

**Linealidad.** A partir del análisis de la desviación estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen, es posible definir los límites de confianza al 95% para dichas variables, de tal modo que las curvas de calibración se expresan como se muestra en el Cuadro 9.

**CUADRO 9.** Curvas de calibración para cada uno de los patrones con sus coeficientes de correlación respectivos

Patrón	Curva de Calibración	Coefficiente de Correlación, $r^2$
Glicerina	$A_g/A_{S1} = (1,17 \pm 0,14) m_g/m_{S1} - (0,01 \pm 0,04)$	0,9957
Monooleína	$A_{mono}/A_{S2} = (1,24 \pm 0,09) m_{mono}/m_{S2} + (0,04 \pm 0,07)$	0,9942
Dioléina	$A_{di}/A_{S2} = (1,08 \pm 0,07) m_{di}/m_{S2} - (0,00 \pm 0,02)$	0,9989
Trioléina	$A_{tri}/A_{S2} = (0,71 \pm 0,03) m_{tri}/m_{S2} + (0,00 \pm 0,01)$	0,9979

Donde:

A: Área del pico respectivo del analito,  $pA*s$

m: Masa del analito, mg

g: Glicerina libre

mono: Monooleína

di: Dioléina

tri: Trioléina

s1: Estándar interno 1 (butanotriol)

s2: Estándar interno 2 (tricaprin)

Con base en los resultados del Cuadro 10, es posible afirmar con un nivel de confianza del 95%, que se rechaza la hipótesis nula, la cual indica que no existe diferencia significativa entre las medias para cada uno de los patrones en estudio.

Al aplicar la prueba de Levene y según los resultados del Cuadro 10, se acepta la hipótesis nula de que todas las varianzas de la población en estudio son iguales para las curvas de glicerina libre, monooleína, dioléina y trioléina.

**CUADRO 10.** Análisis estadístico de las pruebas  $F_{ANOVA}$  y Levene para la determinación de glicerina libre y total

Patrón	Prueba $F_{ANOVA}$	Prueba Levene
	$F_{exp}$	Valor de p
Glicerina libre	603,11	0,575
Monoleína	379,66	0,345
Dioléina	1509,02	0,527
Trioléina	1059,35	0,217

Con base en los resultados anteriores, se puede afirmar que existe homogeneidad de las varianzas para los datos experimentales estudiados. En otras palabras aún cuando los valores de error estadístico difieren entre sí, esto es un efecto aleatorio, de tal modo que existe la probabilidad de que las fuentes de variación sean las mismas.

**Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).** Estos parámetros tienen una importancia especial en la determinación de glicerina libre, ya que a menor cantidad de esta variable mejor calidad presenta el biodiésel. Los límites de detección y cuantificación para cada uno de los análisis se perciben en el Cuadro 11.

**CUADRO 11.** Límites de detección y cuantificación para cada analito

Patrón	Límite de Detección, LD	Límite de Cuantificación, LC
	mg/mg	mg/mg
Glicerina libre	0,045	0,077
Monoleína	0,108	0,203
Dioléina	0,023	0,041
Trioléina	0,034	0,065

**Precisión.** La repetibilidad se evalúa para los dos analistas participantes. Los resultados se distinguen en el Cuadro 12, mientras que los resultados de repetibilidad intermedia se aprecian en el Cuadro 13.

**CUADRO 12.** Análisis de repetibilidad para la determinación de glicerina libre y total

	Repetibilidad de AWM Coeficiente de Variación, CV (%)			Repetibilidad de DOC C. de Variación, CV (%)	
	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto	Nivel Bajo	Nivel Alto
	Glicerina libre	6,78	7,26	1,40	8,72
Monoleína	1,76	3,76	1,74	5,30	1,31
Dioléina	3,98	6,50	2,52	2,41	1,14
Trioléina	8,81	8,36	3,69	1,13	1,37

**CUADRO 13.** Análisis de repetibilidad intermedia para la determinación de glicerina libre y total

Variables	Coeficiente Variación, CV (%)			
	Glicerina	Monoleína	Dioléina	Trioléina
Nivel Bajo	7,83	3,70	3,36	6,08
Nivel Alto	1,32	1,55	1,98	2,81

Con base en los resultados de los cuadros anteriores, se puede apreciar que el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) para cada patrón en los diferentes niveles de concentración se mantienen por debajo del valor crítico de 20% (por tratarse de impurezas), para ambos analistas en la prueba de repetibilidad como en la de repetibilidad intermedia [10].

**Veracidad.** Se analiza una muestra de un productor local de biodiésel B. En la Figura A2 se presenta el cromatograma de la muestra inicial, en la cual se percibe que el contenido de di- y triacilglicéridos tienen ámbitos de trabajo mayores a los que se establecen a la norma en estudio. Por tanto, para su evaluación se realiza una dilución de la muestra.

Las curvas que se obtuvieron para la evaluación de recuperación de la glicerina libre, monooleína, dioléina y trioléina se presentan en la Figura 5, en tanto que sus respectivos resultados de los porcentajes de recuperación se observan en el Cuadro 14.

Los porcentajes de recuperación se mantienen dentro del criterio de aceptación establecido de 75 a 125 %, por tratarse de un método que evalúa impurezas [4].

Con base en la valoración de los parámetros de desempeño y el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos se concluye que los dos métodos en estudio: Determinación del Contenido Total de FAME y Determinación de la Glicerina Libre y Glicerina Total en Biodiésel, por cromatografía de gases, se encuentran bajo control estadístico y analítico; además, permite establecer una evaluación constante; demostrando que los procedimientos analíticos son adecuados para su uso como una prueba de análisis de rutina en el CELEQ.

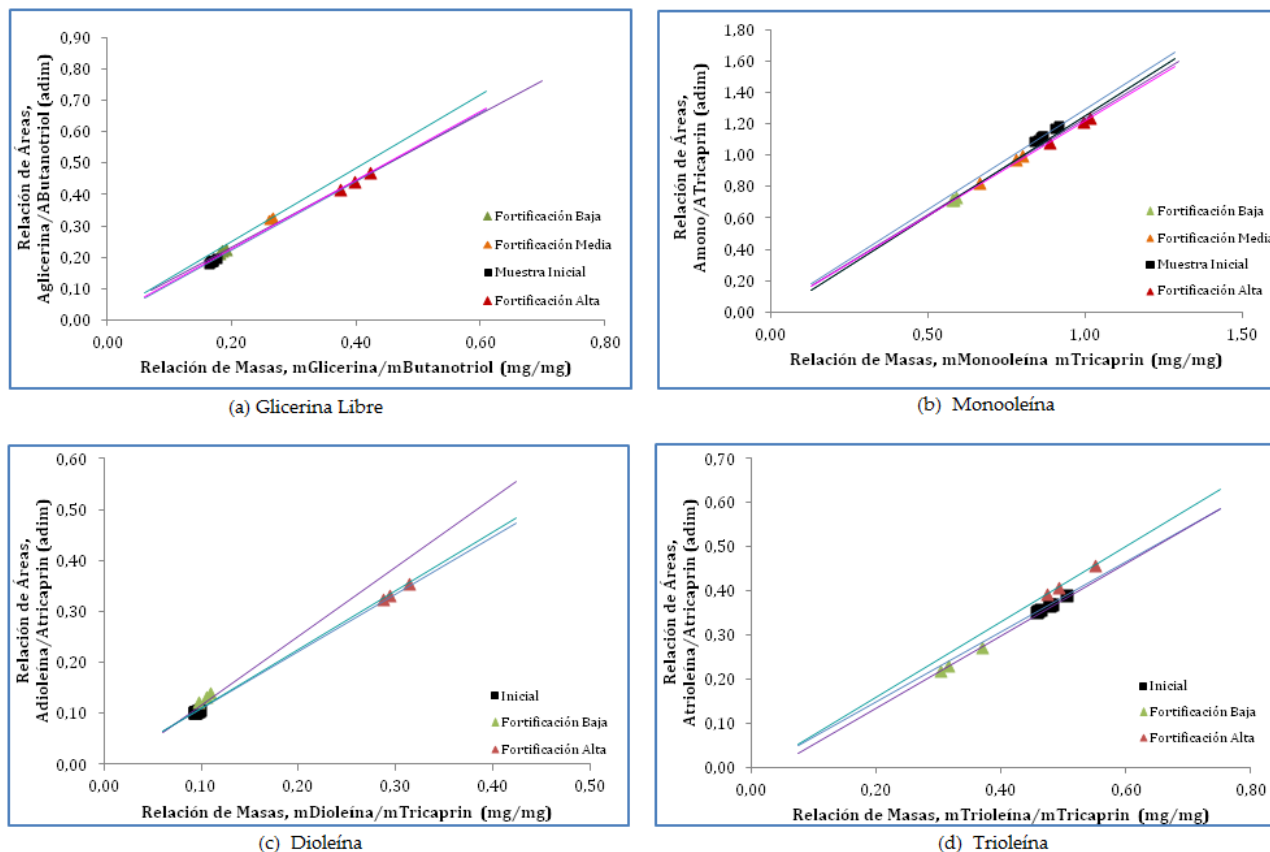


FIGURA 5. Gráficos para la evaluación de recuperación a tres niveles de concentración.

CUADRO 14. Porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas

	Porcentaje de Recuperación (%)		
	Fortificación Baja	Fortificación Media	Fortificación Alta
Glicerina libre	95,37	96,82	99,72
Monooleína	102,41	83,79	107,62
Dioleína	100,35	-	102,57
Trioleína	121,08	-	88,82

IV. REFERENCIAS

[1] AENOR; Asociación Española de Normalización y Certificación, *Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Análisis por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos*, Designación UNE-EN ISO 5508, España, 1996.

[2] AENOR; Asociación Española de Normalización y Certificación, *Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linoleico*, Designación UNE-EN ISO 14103, España, 2011.

[3] ASTM; American Society for Testing Materials, *Standard test method for determination of total monoglycerides, total diglycerides, total triglycerides, and free and total glycerin in B-100 biodiesel methyl esters by gas chromatography*, Designación D-6584, Estados Unidos, 2013.

- [4] Bliesner, D. M., *Validating chromatographic methods*, Editorial John Wiley & Sons Inc., Estados Unidos, 2006.
- [5] Castillo, D., 12 de diciembre del 2013. Costa Rica: entre los 10 mejores del mundo en desempeño energético (en línea). La Nación. San José. Costa Rica. Descargada: 30 de abril, 2014, [http://www.nacion.com/nacional/servicios-publicos/desempeno\\_energetico-Costa\\_Rica-Foro\\_Mundial-energia\\_renovable\\_0\\_1383661811.html](http://www.nacion.com/nacional/servicios-publicos/desempeno_energetico-Costa_Rica-Foro_Mundial-energia_renovable_0_1383661811.html).
- [6] ECA; Ente Costarricense de Acreditación, *Guía para la validación de métodos*, Designación ECA-MC-P001-G01, Versión 1, Fecha de Emisión: 04-08-2010.
- [7] Magnusson, B.; Ornemark, U. (eds.), *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2 Edition, 2014.
- [8] McCormick, R.; Westbrook, S., *Biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels*, ASTM 6751-15, American Society for Testing Materials, Descargada: 14 de abril, 2015, [http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/Q207/q207\\_aprmccwes.html](http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/Q207/q207_aprmccwes.html).
- [9] Meier, P.C.; Zünd, R.E., *Statistical methods in analytical chemistry (programa SMAC)*, Wiley, Nueva York, 1993.
- [10] Miller, J.; Miller, J., *Estadística y quimiometría para química analítica*, Person: Prentice Hall: Madrid, 2002.
- [11] Minitab® 17, Statistical Software, 2014.
- [12] Molina, A.; *Balance Energético Nacional 2011*, Ministerio de Ambiente y Energía, Dirección Sectorial de Energía, Costa Rica, 2012.
- [13] Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 75.02.43:07, *Biocombustibles. Biodiesel (B100) y sus mezclas con aceite combustible diesel. Especificaciones*, Anexo de la Resolución No. 198-2007 (COMIECO-XLIV).
- [14] Robles Chaves, D., *Desarrollo de un método para la purificación y determinación volumétrica de glicerina en muestras de producto crudo e implementación del método ASTM para la cuantificación de glicerina total y libre en biodiesel por cromatografía de gases*, Tesis de licenciatura en Química, Universidad de Costa Rica: Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, 2013.
- [15] Sandoval, S., *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*, Sección Metrología Ambiental y de Alimentos, Departamento de Salud Ambiental, Santiago, Chile, 2010.
- [16] Sigma, Aldrich. *Chromatography products for analysis & purification*, Estados Unidos, 2013-2015.

## AGRADECIMIENTO

A todo el personal del CELEQ por su apoyo, cooperación y paciencia, en especial a los profesores de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica que laboran como investigadores en el centro por su dirección y guía. Un sincero agradecimiento al Sr. Douglas Oviedo por su colaboración en el laboratorio.

## APÉNDICE

### Determinación del Contenido Total de FAME

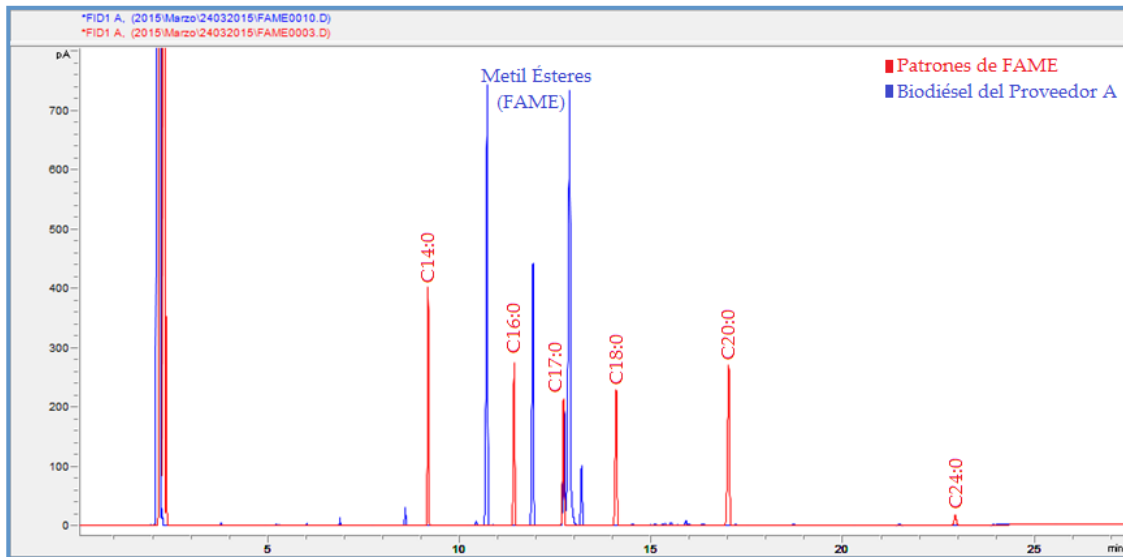


FIGURA A1. Cromatograma de la corrida a mayor concentración de los patrones de FAME utilizados, en contraposición a la muestra de biodiésel analizada del proveedor A.

### Determinación de la Glicerina Libre y Total

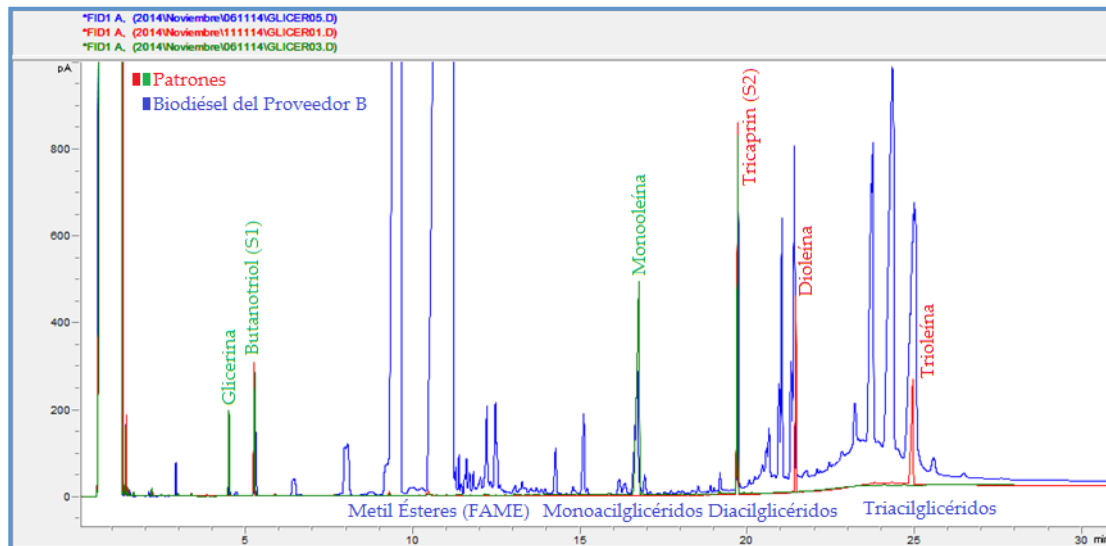


FIGURA A2. Cromatograma de la corrida a mayor concentración de los patrones en contraposición a la muestra de biodiésel analizada del proveedor B.