



UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA EM
CROMATOGRAFIA GASOSA RÁPIDA (Fast GC)
PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FAME EM
BIODIESEL**

FILIPPE LINS DA SILVA

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

FILIPPE LINS DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA
EM CROMATOGRAFIA GASOSA RÁPIDA (*Fast GC*) PARA DETERMINAÇÃO DO
TEOR DE FAME EM BIODIESEL

Maceió – AL

2021

FILIPPE LINS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA
EM CROMATOGRAFIA GASOSA RÁPIDA (*Fast GC*) PARA DETERMINAÇÃO DO
TEOR DE FAME EM BIODIESEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Área Química Analítica, Linha de pesquisa Química Analítica e Ambiental, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Heberle Bortoluzzi

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Simoni Margareti Plentz Meneghetti

Maceió – AL

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586d Silva, Filipe Lins da.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica baseada em cromatografia gasosa rápida (FastGC) para determinação do teor de FAME em biodiesel / Filipe Lins da Silva. – 2021.
126 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientadora: Janaína Heberle Bortoluzzi.
Co-orientadora: Simoni Margarereti Plentz Meneghetti.
Tese (doutorado em química) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 107-117.
Anexos: f. 118-126.

1. Ácidos graxos. 2. Biodiesel. 3. Ésteres Metílicos de ácidos graxos. 4. Cromatografia gasosa rápida. I. Título.

CDU: 543.544.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
 Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
 57072-970, Maceió-AL, Brasil
 Fone: (82) 3214-1144
 Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **FILIPPE LINS DA SILVA** intitulada: “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA EM CROMATOGRAFIA GASOSA RÁPIDA (Fast GC) PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FAME EM BIODIESEL”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia vinte e sete de novembro de 2020, às 8h, por meio de videoconferência realizada através da ferramenta *WEBCONF*.

Comissão Examinadora:

Janaina H. Bortoluzzi

Profa. Dra. Janaina Heberle Bortoluzzi
 (Orientadora - PPGQB/UFAL)

Eduardo Carasek da Rocha

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
 (Titular Externo – CFM/UFSC)

Josué Carinhanha Caldas Santos

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
 (Titular Interno – PPGQB/UFAL)

Simoni M. Plentz Meneghetti

Profa. Dra. Simoni M. Plentz Meneghetti
 (Coorientadora - PPGQB/UFAL)

Flaviana Cardoso Damasceno

Profa. Dra. Flaviana Cardoso Damasceno
 (Titular Externo – DQI/UFSC)

RESUMO

Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método analítico baseado em cromatografia gasosa rápida com fator de resposta (*Fast* GCRF) e detector de ionização em chama, onde foi utilizada uma coluna capilar apolar, polidimetilsiloxano, (10 m x 0,10 mm x 0,10 µm), submetida à programação de temperatura com uma única rampa de aquecimento (60 – 360 °C) na velocidade de 60 °C min⁻¹ com tempo total de análise de 5 min. O método *Fast* GCRF foi aplicado na quantificação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - Fatty acid methyl esters) totais em quinze tipos de biodiesel. As misturas de FAME (C8 – C20) foram produzidas a partir do óleo de algodão, amendoim, amêndoa, canola, chia, coco, dendê, gergelim, girassol, macaúba, milho, mamona, soja, óleo residual de fritura e gordura de frango. As amostras de biodiesel e padrão interno (tricaprilina), foram dissolvidos em hexano. A metodologia validada é seletiva, por meio da qual é possível identificar e quantificar ésteres alquílicos totais. Quando efetuada a troca do solvente hexano por uma mistura de álcool isopropílico e toluol ou adicionado NaCl no processo de dissolução da amostra em hexano, o método permaneceu robusto. No estudo da precisão foram realizadas análises sucessivas em diferentes dias e por analistas diferentes, com valores máximos de desvio padrão relativo (RSD) de 2,3%, 3,6% e 2,8%, para precisão instrumental, repetitividade e intermediária, respectivamente. Na comparação com outros métodos, foram obtidos os valores de $r^2 = 0,9953$ (coeficiente angular = 0,99725) e $r^2 = 0,9962$ (coeficiente angular = 1,00337), em comparação com a norma EN14103 e a metodologia de GC com coluna curta e fator de resposta (GCSCRF), respectivamente, indicando exatidão e excelente grau de concordância entre os resultados nas três metodologias. Os ensaios de recuperação estão dentro do intervalo de 86,16% a 119,12% e os valores de RSD entre 0,4% - 4,49%.

Palavras-chave: Material graxo. Biodiesel. FAME. *Fast* GC.

ABSTRACT

An analytical method based on fast gas chromatography with a response factor (Fast GCRF) and flame ionization detector was developed and validated. In this study, it was used an apolar capillary column, polydimethylsiloxane, (10 m x 0.10 mm x 0, 10 μ m), submitted to temperature programming with a single heating ramp (60 - 360 ° C) at a 60 ° C min⁻¹ speed and total analysis time of 5 min. The Fast GCRF method was applied to quantify total fatty acid methyl esters (FAME) in fifteen biodiesel samples types. The FAME mixtures (C8 - C20) were produced from cottonseed oil, peanuts, almonds, canola, chia, coconut, palm oil, sesame, sunflower, macauba, corn, castor bean, soy, residual frying oil and chicken fat. hexane was used to dissolve the biodiesel samples and the internal standard (tricaprilene). The validated methodology is selective and it able to identify and quantify total alkyl esters. Changing sample preparations conditions like hexane changed for an isopropyl alcohol and toluol mixture or adding NaCl in the at sample dissolving didn't affects the Fast GCRF method robustness. The maximum values of relative standard deviation (RSD) of 2.3%, 3.6% and 2.8%, were calculated for instrumental precision, repeatability and intermediate precision, respectively, by successive analyzes in different days and different analysts. In comparison with other methods, the values of $r^2 = 0.9953$ and slope = 0.99725 (for Fast GCRF *versus* GCEN14103 standard), $r^2 = 0.9962$ and slope = 1.00337 (for Fast GCRF *versus* GC methodology with short column and response factor - GCSCRF) indicating accuracy and agreement between the results in the three methodologies. The recovery tests are within the range of 86.16% to 119.12% and the RSD values between 0.4% - 4.49%.

keywords: Fatty material. Biodiesel. *FAME*. *Fast GC*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de transesterificação de triacilglicerídeos.....	18
Figura 2: Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel.	19
Figura 3: Gráfico do levantamento bibliográfico com base nos termos “gas chromatography” e “biodiesel”.....	22
Figura 4: Gráfico: levantamento bibliográfico com base nos termos “GC”, “FAMES” e “biodiesel”.	23
Figura 5: Sistema reacional empregado nas reações de transesterificação (1- condensador; 2- termopar; 3- sistema de refrigeração; 4- balão volumétrico; 5- banho de óleo; 6- sistema de aquecimento e agitação).	49
Figura 6: Espectros de RMN ¹ H para monitoramento da reação de transesterificação do óleo de soja.....	50
Figura 7: Cromatograma da análise de uma mistura ésteres metílicos do biodiesel de soja pelo método GC EN 14103:2011.	60
Figura 8: Cromatogramas de análises realizadas no método GCSCRF.	62
Figura 10: Espectros da análise de RMN ¹ H para as amostras de B100 dos materiais graxos: A) algodão – 99,72% _{FAME} , B) amêndoa – 96,65% _{FAME} , C) amendoim – 99,46% _{FAME} , D) canola – 99,40% _{FAME} , E) chia – 97,82% _{FAME} , F) coco – 97,91% _{FAME} , G) dendê – 97,49% _{FAME} e H) gordura de frango – 98,27% _{FAME}	65
Figura 11: Espectros da análise de RMN ¹ H para as amostras de B100 dos materiais graxos: A) óleo residual de fritura – 98,14% _{FAME} , B) gergelim – 98,34% _{FAME} , C) girassol – 96,81% _{FAME} , D) macaúba – 98,51% _{FAME} , E) mamona – 98,29% _{FAME} e F) milho – 98,17% _{FAME}	65
Figura 14: Cromatogramas obtidos para a análise do biodiesel B100 de óleo de gergelim, mamona, milho, gordura de frango e coco, no método de caracterização de ácido graxos.....	70

Figura 15: Estrutura molecular do triacilglicerídeo com três cadeias de ácido graxo.	71
Figura 16: Cromatograma obtido com a condição 13 para análise de Fast GCRF descrito na Tabela 8.....	81
Figura 17: Estudo da seletividade do método Fast GCRF através da comparação de cromatogramas do solvente hexano e amostras B100 de diferentes materiais graxos: óleo de coco, óleo de mamona, óleo de algodão, óleo de amêndoa, óleo de dendê, óleo de chia, óleo resid	82
Figura 18: Comparação das metodologias Fast GCRF e GCSCRF curta para análise de %FAME em amostras de biodiesel nas 5 faixas de concentração avaliadas.....	97
Figura 19: Comparação das metodologias Fast GCRF e EN 14103 para análise de %FAME em amostras de biodiesel nas 5 faixas de concentração avaliadas.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações da técnica de cromatografia gasosa à análise de biodiesel; base bibliográfica a partir do ano de 2009 até 2020.....	28
Tabela 2: Classificação de metodologias baseada em GC.	37
Tabela 3: Parâmetros instrumentais otimizados em trabalhos desenvolvidos com a técnica GC/FID para análise FAAE e biodiesel.	40
Tabela 4: Comparação dos parâmetros de desempenho analítico estudados em algumas referências e as propriedades descritas pelo INMETRO (2018).	42
Tabela 5: Reagentes empregados na produção de biodiesel e no preparo das amostras.	47
Tabela 6: Condições reacionais adotadas na produção das amostras de biodiesel nas cinco faixas de concentração (%massa).	52
Tabela 7: Composição em ácidos graxos, determinada por cromatografia gasosa, para os óleos avaliados durante o projeto.	72
Tabela 8: Parâmetros instrumentais estudados durante a otimização do método de <i>Fast GCRF</i>	75
Tabela 9: fator de separação entre o último pico de FAMES e o pico de Padrão interno.	84
Tabela 10: Precisão instrumental para o método <i>Fast GCRF</i> ; SD- desvio padrão. RSD- desvio padrão relativo.	86
Tabela 11: Estudo da repetitividade do método <i>Fast GCRF</i> ; SD - desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo.	88
Tabela 12: Estudo da precisão intermediária do método <i>Fast GCRF</i> com mudança de analista (A e B) e dia de análise; SD - desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo; F - Teste de Fisher.	90

Tabela 13: Precisão intermediária do método <i>Fast</i> GCRF com variação no dia de análises; SD - desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo; F - Teste	92
Tabela 14: Modificações realizadas durante o teste da robustez do método e resposta obtida com uma amostra de biodiesel metílico de algodão, amendoim e amêndoa. 93	
Tabela 15: %FAME obtidos nas análises de biodiesel nos métodos EN 14103, GCSCRF e <i>Fast</i> GCRF nas faixas: < 20%, 20 – 40% e 40 – 60%.	95
Tabela 16: %FAME obtidos nas análises de biodiesel nos métodos EN 14103, GCSCRF e <i>Fast</i> GC nas faixas: 60 – 80% e 80 – 100%.	96
Tabela 17: Ensaios de recuperação com a amostra de biodiesel de CANOLA, fortificada com B100 metílico de canola em três níveis de concentração.	99
Tabela 20: Ensaios de recuperação com a amostra de biodiesel de MILHO, fortificada com B100 metílico de dendê em três níveis.	100
Tabela 19: Figuras de mérito avaliadas no processo de validação da metodologia <i>Fast</i> GCRF aplicada à análise de biodiesel.	102
Tabela 20: Comparação dos parâmetros instrumentais otimizados no desenvolvimento do método de <i>Fast</i> GCRF, proposto nesta tese, e parâmetros empregados nos artigos utilizados como base bibliográfica na análise de biodiesel por GC.	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – *Analysis of Variance* – Análise de Variância

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM – *American Society for Testing Materials* – Sociedade Americana para Testes Materiais

B100 – Biodiesel com 100% de composição em ésteres alquílicos

B11 – Mistura 89% óleo diesel e 11% biodiesel

B15 – Mistura 85% óleo diesel e 15% biodiesel

EPA – United States Environmental Protection Agency – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos.

FAME – *Fatty acid methyl esters* - Ésteres metílicos de ácidos graxos

Fast GC - *Fast gas chromatography* - Cromatografia gasosa rápida

FID – Detector de Ionização em Chama

GC – *Gas chromatography* – Cromatografia Gasosa

GC/FID – *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector* - Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama

GC-MS – *Gas Chromatography/ Gas chromatography/ mass spectrometry* – Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSGC – *High Speed Gas Chromatography* – Cromatografia Gasosa de Alta Velocidade

ICH – *International Conference on Harmonization* – Conferência Internacional sobre Harmonização

IEC – *International Electrotechnical Commission* – Comissão Eletrotécnica Internaiconal

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO – *“International Organization for Standardization”* – Organização Internacional para padronização

PI – Padrão Interno

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RSD – *“Relative Standard Deviation”* – Desvio Padrão Relativo

SD – *“Standard Deviation”* – Desvio Padrão

SEF – *Speed Enhancement Factor* – Fator de Aumento de Velocidade

TOFMS – *Time-of-flight Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massa de Tempo de Voo

UV – Espectroscopia ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Biodiesel	18
3.2	Aplicação de cromatografia gasosa à análise de biodiesel e desenvolvimento da técnica de <i>Fast GC</i>.....	20
3.3	Evolução da análise de biodiesel por GC	31
3.3	Validação de métodos baseados em GC para análise de FAAE em biodiesel	41
3.4.1	Parâmetros de desempenho analítico	43
3.4.1.1	Seletividade.....	43
3.4.1.2	Precisão	44
3.4.1.3	Robustez	44
3.4.1.4	Exatidão	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Reagentes e material.....	46
4.2	Produção de amostras de biodiesel padrão B100 (100% FAMES)	47
4.3	Comprovação da conversão total de TAG em FAME (biodiesel B100)..	49
4.4	Caracterização dos materiais graxos.....	51

4.5	Produção das amostras de biodiesel em diferentes intervalos de teor de FAME para todos os tipos de materiais graxos	52
4.6	Identificação de interferentes por meio da técnica de espectrometria de massas.....	53
4.7	Purificação das amostras de biodiesel	53
4.8	Desenvolvimento da metodologia proposta: <i>Fast</i> GCRF com fator de resposta.....	54
4.9	Validação da metodologia proposta: <i>Fast</i> GCRF com fator de resposta	56
4.9.1	Seletividade	56
4.9.2	Precisão	56
5.9.2.1	Aplicação do teste de <i>Grubbs</i>	57
4.9.3	Robustez.....	58
4.9.4	Exatidão - Comparação de metodologias.....	59
5.9.4.1	Método de referência 01: Norma Europeia 14103	59
5.9.4.2	Método comparativo 02: Cromatografia gasosa de coluna curta com fator de resposta – GCSCRF	61
5.9.4.3	Aplicação do teste estatístico ANOVA.....	62
4.9.5	Exatidão – Ensaios de recuperação	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Caracterização dos padrões de biodiesel por RMN ¹H.....	64
5.2	Análises de interferentes em GC/MS	67
5.3	Determinação da composição de ácidos graxos dos óleos e gorduras	69
5.4	Otimização do método de <i>Fast</i> GCRF.....	74
5.5	Validação da metodologia <i>Fast</i> GCRF para a análise de FAMEs em biodiesel	81
5.5.1	Seletividade	82

5.5.2 Precisão	85
5.5.2.1 Precisão instrumental	85
5.5.2.2 Intra- ensaio (Repetitividade)	87
5.5.2.3 Precisão intermediária.....	89
5.5.3 Robustez	93
5.5.4 Exatidão: Método de referência e metodologia comparativa	94
5.5.5 Exatidão: Ensaios de recuperação	98
 5.6 Resumo das figuras de mérito avaliadas durante a validação da metodologia de <i>Fast GCRF</i> com fator de resposta e respectivos indicadores	102
 5 CONCLUSÕES	105
 6 PERSPECTIVAS.....	106
 REFERÊNCIAS	107
 ANEXO 1	118
 ANEXO 2	126

1 INTRODUÇÃO

O biodiesel, formado por uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, atrai atenção significativa devido à sua característica renovável e disponibilidade de óleos e gorduras vegetais ou animais dos quais, esse biocombustível é produzido. Logo é definido como uma mistura de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (C6 – C20) que pode ser sintetizado por meio de reações de esterificação e transesterificação a partir de diferentes matérias-primas (PASA et al., 2020).

Atualmente, 46% do biodiesel é produzido nos EUA, 24% no Brasil e 15% na União Europeia e, dependendo da região, o biodiesel é produzido a partir de diversas matérias-primas, tais como, o óleo vegetal, óleo vegetal residual, algas, gorduras animais (sebo bovino, banha de porco, restos de pele de aves, peixes e insetos), microorganismos, dentre outras (ABID e BENHIMA, 2019)

Além de renovável e biodegradável, o biodiesel pode ser adicionado ao diesel convencional devido às suas propriedades físico-químicas semelhantes e, mesmo uma pequena adição de biodiesel como 12% v/v (percentual mínimo de biodiesel acrescido ao óleo diesel no Brasil atualmente), gera diminuição de cerca de 11% das emissões de hidrocarbonetos e 8% das emissões de monóxido de carbono (SILVA et al., 2018; HUPP et al., 2018; ANP, 2012).

De acordo com as orientações da norma EN 14103, indicada pela ANP, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, a pureza do biodiesel é expressa como o teor de ésteres alquílicos de ácidos graxos, determinado por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (*Gas Chromatography – Flame Ionization Detector, GC/FID*) (ANP, 2014; Braun et al., 2017).

No Brasil, muitas matérias-primas diferem substancialmente daquelas utilizadas na Europa e nos Estados Unidos para produção de biodiesel, com isto, os parâmetros da norma EN 14103 não são adequadas para análise de qualquer tipo de biodiesel produzido no Brasil, devido ao uso de padrões internos no preparo da amostra, os quais são encontrados em alguns tipos de materiais graxos (PRADOS et al., 2012).

Cada tipo de matéria-prima tem sua constituição característica em termos de ácidos graxos e, como o biodiesel é produzido a partir de diferentes óleos e gorduras vegetais ou animais de qualidades variadas, é necessário estabelecer parâmetros de qualidade do biodiesel para garantir o grau de pureza, a identificação de contaminantes, o desempenho do biodiesel como combustível e evitar danos no motor, independente da matéria-prima (OKULLO et al., 2013).

O aumento do percentual de adição de 12% (B12), em volume, de biodiesel ao óleo diesel comercial no Brasil em março de 2020 e, a perspectiva da adição de 15% (B15) até o ano de 2023, traduz a importância da otimização e validação de metodologias analíticas cada vez mais rápidas e confiáveis para a análise de ésteres alquílicos de ácidos graxos provenientes de diferentes matérias-primas (TERCINI et al. 2018; ANP, 2020).

A análise rápida em cromatografia gasosa pode ser obtida através da otimização dos principais parâmetros instrumentais, tais como, tipo e velocidade do gás de arraste, comprimento e diâmetro da coluna capilar, desde que, a resolução dos picos não seja afetada (DESTAILLATS; CRUZ-HERNANDEZ, 2007).

Em relação a validação de métodos apropriados para análise de biodiesel no Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, estabelece parâmetros para o procedimento de validação, a fim de obter resultados reproduzíveis para diferentes amostras em diferentes laboratórios, garantindo que novos métodos gerem informações confiáveis sobre as amostras (INMETRO, 2018)

Considerando a importância do desenvolvimento de novas metodologias analíticas empregadas em escala industrial, o Laboratório de Catálise e Reatividade Química, GCaR, tem testado novos tipos de catalisadores e otimizado as condições reacionais para a produção de biodiesel (DA SILVA et al., 2017; DE JESUS et al., 2019). Nesse contexto, a otimização e validação do método empregando a cromatografia gasosa rápida para quantificação de ésteres metílicos de ácidos graxos, baseia-se na necessidade de um método rápido e confiável a ser utilizado na caracterização de biodiesel oriundo de diferentes tipos de materiais graxos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica baseada em cromatografia gasosa rápida com fator de resposta (*Fast GCRF*) utilizando um cromatógrafo convencional para análise de biodiesel.

2.2 Objetivos Específicos

Adaptar o equipamento de GC/FID convencional à técnica de Fast GC com base no método de coluna curta e fator de resposta, otimizando os fatores de tempo de retenção, programa de temperatura do forno, pressão e fluxo do gás de arraste.

Aplicar o método supracitado, em amostras de biodiesel provenientes de diferentes materiais graxos, tais como, algodão, amendoim, amêndoa, canola, chia, coco, dendê, gergelim, girassol, gordura de frango, macaúba, mamona, milho, óleo residual de fritura e soja.

Validar a metodologia de *Fast GCRF* a partir da análise das figuras de mérito: seletividade, precisão, robustez e exatidão.

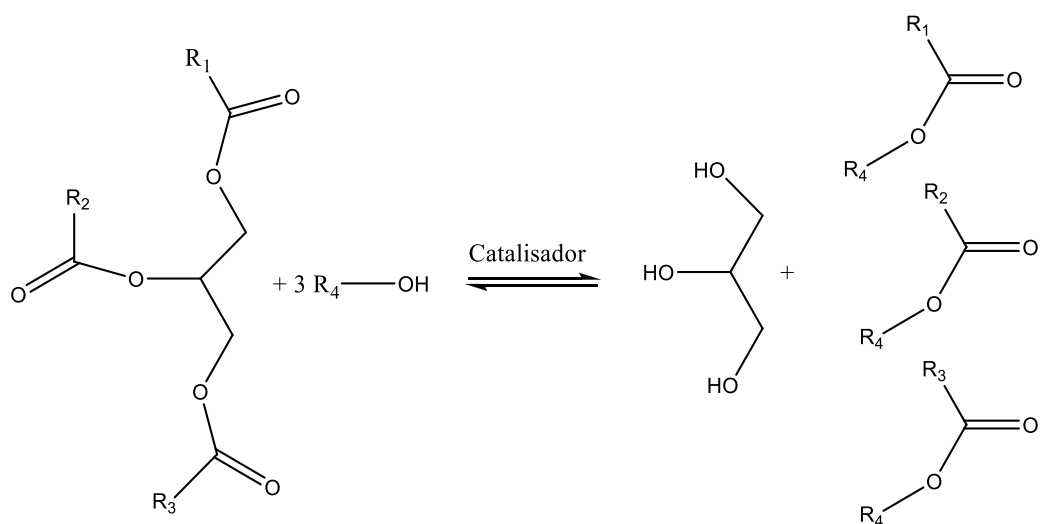
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

O biodiesel é definido como o “combustível composto por alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias-graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal”, e que atenda às especificações técnicas na Resolução N° 45 de 2014 da ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2014).

Durante a reação de transesterificação (Figura 1), são formados monoacilglicerídeos (MAG) e diacilglicerídeos (DAG) como produtos intermediários e que permanecem em pequenas quantidades no biodiesel, juntamente com o triacilglicerídeos (TAG) parcialmente reagidos, além de glicerol não removido no processo de separação, ácidos graxos livres (AGL), resíduos de álcool e catalisador, acarretando a contaminação do biodiesel (PINTO, et al., 2005; MEHER, VIDYASAGAR, NAIK, 2006; OKULLO et al., 2013).

Figura 1: Reação de transesterificação de triacilglicerídeos.



Fonte: DA SILVA, 2018.

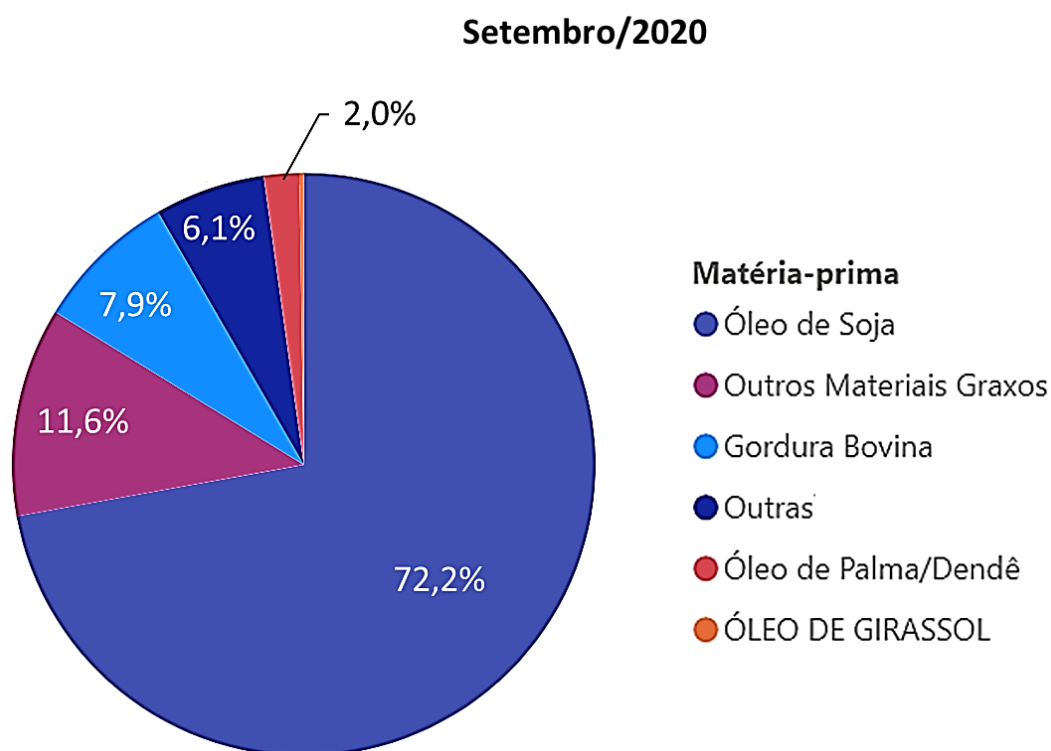
Nota: R₁, R₂ e R₃ são as cadeias carbônicas dos ésteres; R₄ são as cadeias carbônicas do álcool empregado nesta reação.

A presença de MAG, DAG e TAG no biodiesel pode causar a formação de depósito de carbono no sistema de combustão a diesel, enquanto um alto teor de glicerol livre pode provocar o entupimento no injetor e elevar o nível de emissão de aldeídos, logo, a quantidade desses contaminantes no biodiesel é o principal fator que determina a qualidade deste biocombustível (SANEK, PECHA E KOLOMAZNIK 2013).

A matéria-prima empregada na produção de biodiesel é determinada de acordo com a disponibilidade e a acessibilidade na região onde este biocombustível é produzido, de forma que, na União Europeia utilizam-se óleos de girassol e canola para a produção de biodiesel, enquanto nos Estados Unidos, as gorduras animais e óleo de soja são as principais fontes de material graxo para esta finalidade (HAAS, 2005; SATO et al., 2016).

No Brasil, conforme observado na Figura 2, o óleo de soja é a principal matéria-prima empregada na produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2019).

Figura 2: Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel.



Fonte: ANP, 2020.

Devido à complexidade de algumas matérias-primas, como gordura animal, ou de misturas biodiesel-diesel, é necessário o desenvolvimento de métodos baseados na técnica de cromatografia gasosa efetuando mudanças instrumentais ou substituindo o padrão interno C17:0 ou C19:0 (utilizados na EN 14103), por padrões com características semelhantes às do analito e ausente no biodiesel (MARQUES et al., 2010; SANTOS; VIEIRA; VALENTINI, 2013).

3.2 Aplicação de cromatografia gasosa à análise de biodiesel e desenvolvimento da técnica de *Fast GC*

A análise da composição de ésteres alquílicos de ácidos graxos (FAAE) em amostras de biodiesel é a principal característica físico-química no controle de qualidade na produção do biodiesel comercializado e é expressa na forma de fração de massa em porcentagem devendo ser superior à 96,5% (ANP, 2014; TERCINI et al., 2018).

A quantificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) ou ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE), constituintes do biodiesel, é realizada aplicando diversas técnicas analíticas, principalmente cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e técnicas espectrométricas (SILVA et al., 2018; DO SANTOS et al., 2019).

O procedimento convencional em GC envolve a análise da amostra de biodiesel usando detectores de ionização por chama (FID), gás nitrogênio, hélio ou hidrogênio, puro e inerte, como fase móvel gasosa (gás de arraste) e uma coluna capilar contendo a fase estacionária que pode ser sólida, líquida ou fase ligada, polar ou apolar (LANÇAS, 1986; SKOOG et al., 2006; CHATTOPADHYAY; DAS; SEN, 2011; GAGLIERI et al., 2019).

A GC/FID mostra excelente seletividade e é a principal técnica utilizada para a análise de biodiesel em termos de FAME, mas, alguns trabalhos mostraram que o uso de colunas convencionais com comprimentos acima de 25 m não é vantajoso devido

a análise ser mais demorada (SATO et al., 2016; SILVA et al., 2018; DO SANTOS et al., 2019).

Em alguns estudos, tem-se aplicada cromatografia gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massa (GCMS) a fim de gerar uma impressão digital exclusiva para cada tipo de matéria-prima (FLOOD et al., 2015).

Outro fator importante na produção de biodiesel é a análise da qualidade dos óleos e gorduras a partir dos quais é produzido o biodiesel. É necessário determinar a composição dos ácidos graxos que constituem estas matérias-primas (ROCHA; DE SOUSA; ROCHA, 2013).

No Brasil, o método descrito pela norma europeia EN14103 e a metodologia descrita pela ABNT NBR 15764 são reconhecidos pela ANP como métodos confiáveis para a determinação de FAMES total em biodiesel, ambos utilizando GC e levam aproximadamente 30 min em suas análises (ANP, 20014; ABNT, 2012 SILVA et al., 2018; TERCINI et al., 2018).

A norma EN 14103 (2003) indica o heptadecanoato de metila (C17:0) como padrão interno. O biodiesel produzido a partir de algumas matérias-primas como sebo, no entanto, contém C17:0 em sua composição. Em 2011, o C17:0 foi substituído pelo nonadecanoato de metila (C19:0), porém, os tempos de retenção do C19:0, C18:2 e C18:3 são muito próximos e às vezes prejudica a resolução dos picos (BRAUN et al., 2017).

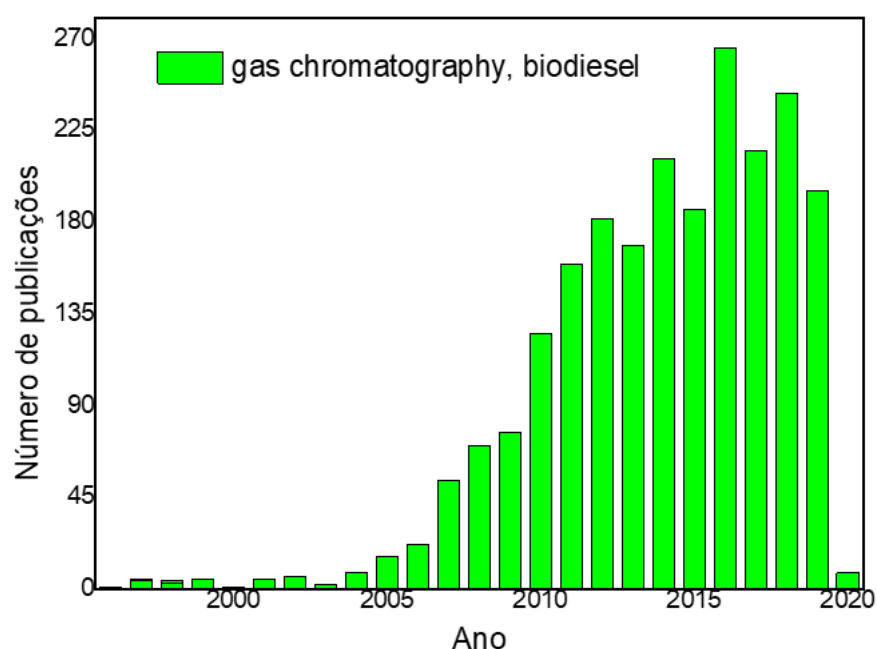
Diversos estudos foram e estão sendo desenvolvidos com a utilização de GC para análise de biodiesel proveniente das mais variadas espécies de matéria-prima graxa e caracterização de misturas diesel-biodiesel empregando diferentes ésteres como padrão interno, colunas cromatográficas com diferentes dimensões e fases estacionárias, mudanças na programação da temperatura e diferentes detectores (FARIA et al., 2007; MARQUES et al., 2010; SANTOS; VIEIRA; VALENTINI, 2013; SOUZA et al., 2016; SILVA et al, 2018; PARK et al., 2019, KUMAR et al., 2019a).

Além destas aplicações da técnica de GC em caracterização de FFAE, outras pesquisas desenvolvem a abordagem desta quanto a determinação do teor de álcool,

glicerol livre, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos, e triacilglicerídeos em amostras de biodiesel, considerando as respectivas normas e legislações (GAMA; GIL; LACHTER, 2010).

De acordo com o levantamento bibliográfico na base de dados da plataforma Reaxys, utilizando os termos “gas chromatography” e “biodiesel”, foi possível observar a ocorrência de publicações sobre estes termos a partir do ano de 1996 (Figura 3) até o momento, com o aumento do número de publicações até o ano 2016, estabilizando a partir deste, totalizando 2.252 artigos publicados até o ano de 2020, provavelmente devido à utilização de técnicas diferentes na análise de biodiesel.

Figura 3: Gráfico do levantamento bibliográfico com base nos termos “gas chromatography” e “biodiesel”.

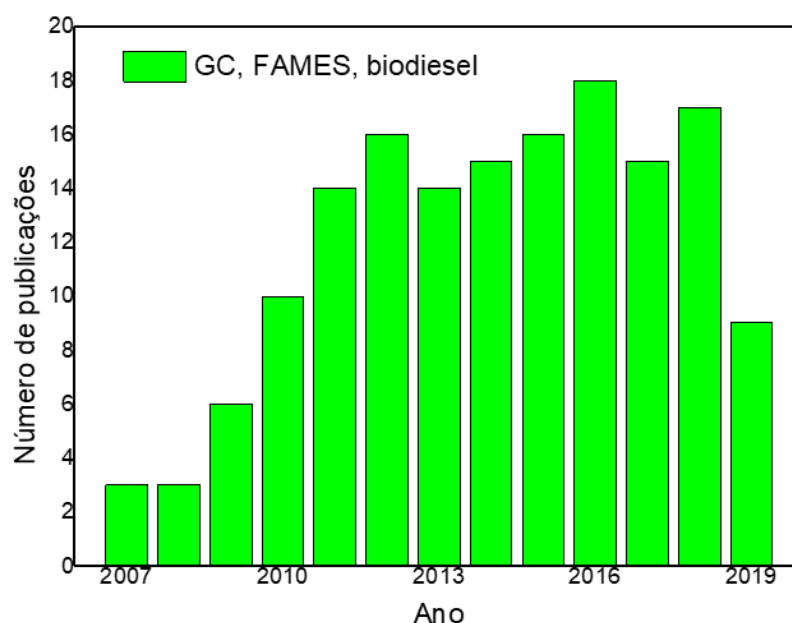


Fonte: Autor, 2020.

O aumento do número de publicações entre 2005 e 2008 deve-se ao início da adição de biodiesel ao diesel convencional comercializado no Brasil (ANP, 2008).

Quando realizado o levantamento baseado nos termos “GC”, “FAMES” e “biodiesel”, o número de publicações é de apenas 159 artigos publicados a partir do ano de 2007 até o ano de 2020 (Figura 4).

Figura 4: Gráfico: levantamento bibliográfico com base nos termos “GC”, “FAMES” e “biodiesel”.



Fonte: Autor, 2020.

Com base na pesquisa realizada com os termos “gas chromatography” e “biodiesel”, foram considerados artigos publicados no período entre os anos de 2009 e 2020 para desenvolver a revisão de literatura deste trabalho e verificar a evolução da técnica de cromatografia gasosa aplicada à análise de ésteres alquílicos em amostras de biodiesel e misturas biodiesel-diesel.

A norma europeia EN 14103 é aplicada com frequência para análise de FAAE e apresenta uma versão de 2003 e uma versão revisada em 2011, ambas aplicadas a análise de ésteres metílicos ou etílicos por GC/FID, onde alguns trabalhos demonstram modificações no diâmetro interno da coluna apolar, utilização de padrões internos diferentes (C12:0, C17:0, C18:0 ou C19) e diferentes programações de temperatura com tempo de análise que variam entre 30 e 60 min e resultados compatíveis com outras metodologias de referência, como a norma supracitada. (MARQUES et al., 2010; SANTOS; VIEIRA; VALENTINI, 2013; ROCKEMBACH et al. 2014; FOLAYAN et al., 2019; SHAPAVAL, et al., 2019).

Em outras metodologias, o tricosanoato de metila (C23:0) foi empregado como padrão interno em análises de 25 a 30 min em GC/FID com razões *split* de 1:50 ou 1:80, coluna polar ou apolar com diâmetros internos de 0,25 ou 0,32 mm e comprimentos de 30 e 100 m para determinar FAME e FAEE em biodiesel de amendoim, canola, girassol, milho, soja, macaúba, óleo residual, dentre outros (SCHOBER et al., 2009; PRADOS et al., 2012; CANESIN et al., 2014; SOUZA et al., 2016; PASA et al., 2020)

Singh et al., 2014, utilizaram misturas padrões de 17 ésteres metílicos saturados e insaturados para determinar o fator de resposta individual de cada éster em relação ao padrão interno nonadecanoato de metila (C19) empregado na norma 14103:2011, para comparar o teor de ésteres experimentais com os teóricos e determinaram que a norma supracitada apresenta a desvantagem de utilizar um fator de resposta para todos os ácidos graxos, independentemente de seu comprimento e insaturação da cadeia, e fornece quantidades de ésteres que não correspondem aos valores teóricos.

Logo, outras metodologias estão em constante desenvolvimento para determinação de FAME ou FAEE em biodiesel, nas quais são aplicadas, principalmente, as técnicas de GC/FID ou GC-MS com diferentes fontes de ionização, modificações nos parâmetros instrumentais de análise, alteração no comprimento e diâmetro interno das colunas e emprego de diferentes tipos de fase estacionária.

Por exemplo, de acordo com as diretrizes da American Oil Chemists' Society (AOCS), Carvalho et al., 2012, analisaram os derivados de éster metílico do óleo de algodão, canola, girassol, milho e soja em GC/FID empregando coluna polar (30 m × 0,25 mm × 0,20 µm), razão *split* 100:1, 30 min de análise, para estudos comparativos com duas metodologias baseada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV).

Fan, Wang e Yun, 2012, empregaram uma coluna de aço inoxidável (2 m × 3 mm) empacotada com polietilenoglicol (5%), em GC/FID, mantida sob isotérmica a 180 °C e gás nitrogênio como gás de arraste a 30 mL min⁻¹, para quantificar FAMES em amostras de biodiesel produzidas a partir do óleo de colza.

De forma semelhante, metodologias diversas utilizam GC para análise de FAME ou FAEE em biodiesel do óleo de milho, girassol, soja, amendoim, coco, sementes de mamona, sementes de algodão, linhaça e óleo residual, separados em colunas com as mesmas dimensões (30 m x 0,25 mm) porém, com diferentes níveis de polaridade e submetidas às mudanças na taxa de aquecimento ou na temperatura da isoterma, tempos de retenção variados e análises de 25 a 34 min (SUGANYA; NAGENDRA GANDHI; RENGANATHAN, 2013; MUSHARRAF; AHMED; ZEHRA, 2015; ALMEIDA et al., 2016; PURANDARADAS et al., 2018; ASLAN; AKA; KARAOGLU, 2018).

Mustafa et al, 2016, testaram dois tipos de fase estacionária, polietileno glicol e líquido iônico (ambas em coluna capilar de 30 m de comprimento) em GC/FID, para separar ésteres metílicos de biodiesel e misturas biodiesel-diesel, verificando que, devido a elevada polaridade da fase estacionária líquido iônica, a mesma se demonstrou capaz de separar simultaneamente os ésteres metílicos e os compostos constituintes do diesel convencional.

Outros autores empregaram coluna apolar (fase estacionária de polietilenoglicol) com 30 m de comprimento e diâmetro de 0,32 mm em métodos de GC/FID para determinação de FAME em amostras de biodiesel de origem vegetal ou animal em tempos de 9 a 35 min, dentre os quais, foi estabelecida uma relação diretamente proporcional entre as condições de tempo, temperatura e razão molar com a porcentagem de rendimento reacional em ésteres metílicos (OLIVEIRA et al., 2013; MILINA; MUSTAFA, 2013; RASHID; ANWAR, 2008; SAMAT et al., 2018).

Em 2019, três metodologias baseadas em GC para quantificação da composição de FAME em biodiesel e misturas biodiesel-diesel, adotaram coluna levemente polar 15 m x 0,32 mm (ABID; TOUZANI; BENHIMA, 2019), altamente polar de 60 m x 0,25 mm (PARK et al., 2019) e polar de 100 m x 0,25 mm (SANTOS et al., 2019), com análises de 34,5 min, 30 min e 55 min, respectivamente, por meio das quais verifica-se a influência simultânea das dimensões das colunas, temperatura, tipo da fase estacionária, fluxo, razão *split* e tipo de solvente empregados no preparo das amostras.

Em relação a diferentes tipos de fonte de ionização em GC-MS, o emprego de ionização química (SELVARAJ et al., 2019) ou ionização por impacto de elétrons com normalização das áreas (KUMAR et al., 2019b) tem sido frequente no estudo da composição química de materiais graxos, vegetais ou animais, e na determinação de ésteres alquílicos após o processo de transesterificação, com base na biblioteca de dados do espectrômetro de massas.

Estudos também são realizados para avaliar sistemas catalíticos na reação de transesterificação, determinação de fator de correção das áreas dos picos cromatográficos, quantificação de compostos minoritários e controle da qualidade e desempenho do biodiesel por meio da concentração de FAAE.

Visentainer, 2012, analisou 13 ésteres metílicos em uma mistura padrão certificada, a partir dos quais, determinaram o fator de correção de cada tipo de FAME em relação ao detector FID em análise de cromatografia gasosa e concluíram que, a padronização interna, associada aos fatores teóricos de correção, eleva a precisão interpretação dos resultados para amostras de óleos e biodiesel.

Vijayan et al., 2018, utilizando GC/FID, investigaram a influência na temperatura sobre a cristalização de ácidos graxos presentes biodiesel e possíveis problemas operacionais deste biocombustível produzido a partir de diferentes tipos de materiais graxos, tais como, girassol, coco, pinhão manso, farelo de arroz, palma, entre outros.

Keera, El Sabagh, e Taman, 2018, aplicaram GC/FID para analisar misturas biodiesel-diesel, com biodiesel produzido a partir do óleo de mamona, para avaliar a influência da concentração do catalisador, da razão molar metanol: óleo, da temperatura e tempo da reação de transesterificação alcalina do óleo de mamona.

Compostos menores, tais como ácidos graxos com estruturas similares, não são detectados pela análise convencional de GC FID, por isso, estudos específicos utilizaram cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector FID (GC×GC) e duas fases estacionárias, sendo uma apolar e outra altamente polar para identificar estes compostos minoritários (MORAES et al., 2011; MOGOLLÓN et al., 2016).

Vale ressaltar a importância da validação de metodologias analíticas por meio, principalmente, do estudo da exatidão e comparação destas metodologias com normas estabelecidas por agências que estabelecem e fiscalizam os parâmetros de qualidade do biodiesel a ser comercializado.

Thoai et al., 2017, desenvolveram uma metodologia para calcular o rendimento de ésteres alquínicos em amostras de biodiesel com base na titulação do glicerol total, produzido durante a conversão de triacilglicerídeos em ésteres. A exatidão do método foi avaliada por meio da comparação dos valores com os resultados obtidos nas análises das mesmas amostras utilizando a norma europeia 140103:2003 empregando GC/FID com padronização interna com heptadecanoato de metila (C17).

Em 2018, Silva e colaboradores, validaram uma metodologia baseada em GC/FID com coluna curta e fator de resposta (GCSCRF) para determinar FAME e FAEE totais em amostras de biodiesel do óleo de soja, onde a separação dos analitos foi realizada em uma coluna apolar com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O método GCSCRF foi comparado com a metodologia da norma EM 14103:2003 e não apresentou variação na exatidão dos resultados.

Na Tabela 1, encontram-se os parâmetros instrumentais e de análise empregadas nos artigos supracitados, os quais foram utilizados como base bibliográfica no desenvolvimento desta tese.

Tabela 1: Aplicações da técnica de cromatografia gasosa à análise de biodiesel; base bibliográfica a partir do ano de 2009 até 2020.

Referência	Técnica	Dimensões da coluna	Padrão interno	Analito	Tempo (min)
SCHOBER et al., 2009.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m	C23:0	FAME	29,3
MARQUES et al., 2010.	GC/FID	30 m x 0,53 mm x 1 μ m	C18:1	FAME	6,0
MORAES et al., 2011.	GC x GC/FID	Coluna 1: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; Coluna 2: 1,9 m x 0,1 mm x 0,1 μ m	Comparação com CRM	FAME	55,0
AKBAR et al., 2009.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,25 mm	-	FAME	
CARVALHO et al., 2012.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,20 μ m	Comparação com CRM	FAME	30,0
PRADOS et al., 2012.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,1 μ m	C23:0 1,2,4-buanotriol e tricaprina	FAME, FAEE, MONO, DAG e TAG.	25,0
VISENTAINER, 2012.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	C23:0	FAME	61,0
FAN, WANG e YUN, 2012.	GC/FID	Empacotada (2 m x 3 m)	C8:0	FAME	60,0

SANTOS, VIEIRA e VALENTINI, 2013.	GC/FID		C12:0		29,3
OLIVEIRA et al., 2013.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m	C17:0	FAME	19,5
MILINA e MUSTAFA, 2013.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m	C17:0	FAME	21,0
SUGANYA, NAGENDRA CANDHI e RENGANATHAN, 2013.	GC - MS	30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	-	FAME e FAEE	> 12,0
ROCKEMBACH et al, 2014.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m	C17:0	FAME	60,0
SINHG et al., 2014.	GC/FID	60 m x 0,32 mm x 0,25 μ m	C19:0	FAME	58,3
CANESIN et al., 2014.	GC/FID	100 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	C23:0		28,0
MUSHARRAF, AHMED e ZEHRA, 2015.	GC - MS	30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	C15:0	FAME	30,0
MUSTAFA et al., 2016.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,2 μ m	C17:0	FAME	63,3
RASHID e ANWAR, 2008.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,35 μ m	C17:0	FAME	20,0

ALMEIDA et al., 2016.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	Tricaprilina	FAME	25,4
SOUZA et al., 2016.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 µm	C23:0	FAEE	30 min
MOGOLLÓN et al., 2016.	GC x GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	-	FAEE	35,0
THOAI et al., 2017.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 µm	C17:0	FAME	22,0
SAMAT et al., 2018.	GC/FID	30 m x 0,32 mm x 0,25 µm	-	FAME	35,0
SILVA et al., 2018	GC/FID	2 m x 0,25 mm x 0,25 µm	C17:0	FAME	21,0
KEERA, EL SABAGH e TAMAN, 2018.	GC/FID	30 m x 0,53 mm x 0,5 µm	-	FAME	60,0
PURANDARADAS et al., 2018.	GC - MS	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	C12:0	FAME	34,0
ASLAN, AKA e KARAOGLU, 2018.	GC - MS	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	-	FAME	-
SELVARAJ et al., 2019.	GC - MS	-	-	FAME	16,0
FOLAYAN et al., 2019.	GC/FID	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	-	FAME	-

PARK et al., 2019.	GC - MS	60 m x 0,25 mm x 0,25 μm	Comparação com CRM	FAME	30,0
Do SANTOS et al., 2019.	GC/FID	100 m x 0,25 mm x 0,25 μm	Comparação com CRM	FAME	55,0
ABID, TOUZANI e BENHIMA, 2019.	GC - MS	15 m x 0,32 mm x 0,10 μm	Comparação com CRM	FAME	32,0
PASA et al., 2020.	GC/FID	-	C23:0	FAEE	-

Fonte: Autor, 2020.

Nota: (-) dimensões da coluna não constam no artigo; CRM (*Certified reference material*) - Material certificado de referência.

Além destes trabalhos, a literatura dispõe de outras centenas de publicações relacionadas aos termos “gas chromatography” e “biodiesel”, porém, com outras finalidades, tais como: redução de emissões de compostos voláteis (GE et al., 2018); adição de aditivos ao biodiesel (KUMAR; DAS, 2018); desenvolvimento de novos catalisadores (DE JESUS et al., 2019); cinética da reação de transesterificação (ZHOU et al., 2019); estabilidade oxidativa do biodiesel (TAMILALAGAN; SINGARAM, 2019); estudo eletroquímico da corrosão (ROCABRUNO-VALDÉS et al., 2018); pirólise (AKANCHA; KUMARI; SINGH, 2019); determinação de glicerol total (MUNIZ et al., 2019), catálise enzimática (ZHANG et al., 2020); otimização da reação de transesterificação (KURNIASIH, 2019); novas fases estacionárias (SHASHKOV; SIDELNIKOV; BRATCHIKOVA, 2019); estudos quimiométricos (ROCHA; SHEEN, 2019), entre outros.

3.3 Evolução da análise de biodiesel por GC

A diminuição do tempo de análise e o aumento da eficiência na quantificação de quantidades mínimas de analito, em cromatografia gasosa rápida (*Fast GC*), tem sido objeto de estudo desde 1957, quando as colunas capilares foram introduzidas à esta técnica analítica (VAN YSACKER et al., 1993).

Em 1962, Desty et al. demonstraram que, através da redução do diâmetro interno de colunas capilares, é possível reduzir o tempo total da análise cromatográfica e, a partir deste experimento, a metodologia passou a ser chamada de cromatografia gasosa de alta velocidade (*high speed gas chromatography*, HSGC). (DESTY et al., 1962).

Em relação a pressão interna da coluna capilar em análises cromatográficas, Schutjes (1962) demonstrou tanto teórica quanto experimentalmente que o tempo de retenção na análise isotérmica é diretamente proporcional ao diâmetro da coluna no caso de quedas de pressão maiores e diminui proporcionalmente em quedas de pressão menores (GIDDINGS, 1962).

Na década de 1980, vários detectores de sensibilidade à massa, como quadrupolo, espectrometria de massa com combinação de campos magnético e elétrico, e espectrômetros de massa com íon trap, passaram a ser estudados para avaliar sua compatibilidade e desempenho com a HSGC (WOLLNIK et al., 1994)

Por exemplo, a partir da combinação de colunas com diâmetros interno de 50 µm e espectrometria de massa com íon trap, Ysacker V. et al., 1993, obtiveram limites de detecção de 1 pg (no modo de ionização de elétrons) e 5 pg (no modo de ionização química usando CH₄ como gás de reação), e redução do tempo de análise de 1 hora e 40 min (coluna com diâmetro interno de 0,32 mm) para 4 min, com otimização da faixa de trabalho sem perda de resolução e sensibilidade espectral de massa (VAN YSACKER et al., 1993).

Na década de 1990, a combinação on-line de HSGC e espectrometria de massa foi considerada a técnica hifenizada mais eficiente para a separação e identificação de compostos em amostras desconhecidas, utilizando outros tipos de detectores, tais como: ionização de chama, condutividade térmica, fotoionização e detectores de captura de elétrons foram relatados e espectrômetros de massa de tempo de voo (VAN YSACKER et al. 1995).

Em 1994, Wollnik et al. utilizaram a técnica de espectrometria de massa com tempo de voo (*Time-of-flight mass spectrometry*, TOFMS) acoplada a técnica de HSGC com uma coluna apolar de 2,7 m de comprimento e 0,05 mm de diâmetro

interno, para separar uma mistura de 10 compostos (n-hexano, ciclohexano, n-heptano, metilciclohexano, tolueno, n-octano, clorobenzeno, etilbenzeno, oxileno, n-nonano) em 12 (WOLLNIK et al., 1994).

Em 1995, Van Ysacker et al., utilizaram *Fast GC* com espectrometria de massas em modo *full scan*, coluna apolar de (5 m de comprimento e 0,05 mm de diâmetro), pressão do injetor de 1 bar, e aplicaram diferentes rampas de aquecimento (de acordo com o tipo de amostra) para separar padrões de alquilato em 90 s e uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) em 13 min, reduzindo em até 10 vezes o tempo total de análise quando efetuada em coluna com diâmetro interno de 0,32 mm (VAN YSACKER et al., 1995).

Dangan e Amirav, 1996, definiram o fator de aumento de velocidade (*speed enhancement factor* – SEF), expresso pelo produto da redução do comprimento da coluna e o aumento da velocidade linear do gás de arraste, em comparação com as condições normais (comprimento da coluna: 30 m; velocidade do gás de arraste: 34 cm s⁻¹) de GC-MS, de acordo com a equação 01:

$$SEF = \frac{(3000)V}{L(34)} = 88 \frac{V}{L} \quad (01)$$

Onde, V é a velocidade rápida do gás carreador GC (cm s⁻¹) centímetros por e L é o comprimento da coluna (cm) em centímetros, de forma que, de acordo com o valor de SEF, o GC-MS é classificado como: GC-MS convencional (SEF em torno de 1; GC-MS rápido (SEF entre 5-30); GC-MS (SEF no intervalo de 30-400); GC-MS ultrarrápido (SEF no intervalo 400-4000).

De acordo como a definição de Dagan e Amirav, 1996, quanto maior for SEF, mais rápida é a análise de GC-MS. Porém, o SEF não reflete diretamente a redução exata do tempo de análise, pois esta propriedade também é afetada pela temperatura da coluna e sua taxa de programação, principalmente quando se trata de períodos de análise muito reduzidos.

Em 1999, Van Deursen *et al.* desenvolveram um método de *Fast GC FID* para análise de óleo mineral, oligômero industrial e compostos tóxicos no combustível

diesel, empregando uma coluna capilar (5 m de comprimento e 320 µm de diâmetro interno) submetida à programação de temperatura com taxas de aquecimentos mais rápidas que as convencionais, de forma que, obtiveram um tempo de análise de 5 a 20 vezes menor que a análise dos mesmos compostos em colunas curtas com altas velocidades do gás de arraste (VAN DEURSEN, BEENS e CRAMERS, 1999).

Portanto, na literatura é possível observar que, o estado da técnica de *Fast GC* encontra-se em evolução desde a década de 1980 através de estudos experimentais para reduzir o tempo de análise e otimizar a relação custo-benefício da cromatografia gasosa com base em diferentes propriedades, tais como: colunas com diâmetro interno reduzido (SCHUTJES et al., 1982); colunas curtas (RUSSO 1995); análise sob vácuo (CRAMERS; SCHERPENZEEL; LECLERCQ, 1981); aumento da velocidade do gás de arraste (BLUMBERG, 1997); fases estacionárias mais seletivas (LECLERCQ, 1992); espessuras de filme reduzidas (LECLERCQ; CRAMERS, 1985); programação rápida de temperatura (SCHUTJES et al., 1982); colunas em espiral helicoidal (TIJSEN; VAN DEN HOED; VAN KREVELD, 1987), programação de fluxo ou pressão (KORYTÁR et al., 2002), número de pratos teóricos (MATISOVA; DOMOTOROVA, 2003), dentre outros parâmetros instrumentais que, classificam a técnica de separação em *Fast GC*, *very Fast GC* ou *Ultra- Fast GC*, Tabela 2, (DAGAN; AMIRAV, 1996).

De acordo com Schutjes et al., 1982, a diminuição do diâmetro interno de colunas com número excessivo de pratos teóricos, a partir de 300.000, permite diminuir o tempo de análise. Os mesmos autores compararam duas colunas capilares para análise de uma mistura de gases naturais em GC, de forma que, apesar do maior número de pratos teóricos e elevada eficiência de separação da coluna com diâmetro interno de 0,05 mm e comprimento igual a 70 m, a coluna com medidas 3 m x 0,03 mm apresentou maior número de frações dos analitos e menor tempo de análise.

Em 1995, Russo desenvolveu um método de GC para análise do tipo headspace com colunas microcapilares (diâmetro interno de 0,05 mm) com fase estacionária de polissiloxano para analisar misturas complexas de compostos orgânicos voláteis em amostras de óleo essencial de limão, perfumes e água em

tempos de análise relativamente curtos, quando comparados aos de colunas capilares convencionais com diâmetro interno e comprimento maiores.

Cramers, Scherpenzeel e Leclercq, 1981, desenvolveram equações teóricas e estabeleceram condições, consideradas ótimas, para análises de GC-MS com colunas (30 m x 0,4 mm) operadas sob vácuo, considerando a altura mínima do prato teórico, a velocidade linear ideal do gás e a pressão ideal. Os resultados experimentais demonstraram um ganho na velocidade de análise sob vácuo sem perda de eficiência, picos mais estreitos e menores tempo de retenção em relação a análise realizada em condições de pressão atmosférica.

Tijssen et al., 1987, simularam a separação de hidrocarbonetos em *Fast GC*, presentes em gases naturais, em uma com diâmetro interno igual a 0,54 mm e em outra com diâmetro igual a 0,16 mm. A primeira coluna foi utilizada de duas maneiras, reta e em espiral, ambas numa pressão de 0,5 bar, sendo a coluna em espiral com maior velocidade de análise e separação. Quando utilizada a coluna com diâmetro menor, em forma de espiral helicoidal, com pressão igual a 2,0 bar, houve diminuição no tempo de retenção e melhora na separação.

De acordo com Korytár et al., 2002, o aumento de fluxo e da pressão interna da coluna pode reverter a desvantagem de um número pequeno de pratos teóricos em *Fast GC*, por exemplo, uma pressão de 11 bar é suficiente para colunas com diâmetro interno de 0,05 mm e comprimento de até 15 m para gerar o mesmo número de pratos teóricos de uma coluna de 100 m de comprimento e diâmetro interno de 0,32 mm.

Com base nos estudos de Matisova e Domotorova, 2003, o GC muito rápido (*Very Fast GC*), aproximadamente. 25.000 pratos teóricos, é aplicado para análise de rotina de misturas simples, principalmente em estudos de monitoramento e pode ser obtido usando uma coluna curta de cerca de 1 a 3 m de comprimento e com diâmetros internos variando entre 0,05 a 0,32 mm.

A abordagem destes parâmetros para reduzir o tempo de análise, em *Fast GC*, deve estar de acordo com a complexidade da amostra a ser analisada, ponto de ebulição e tempo de retenção de cada tipo de analito (DESTAILLATS; CRUZ-

HERNANDEZ, 2007). Desta forma, *Fast GC* é aplicada em diversas áreas como a determinação dos teores de pesticidas presentes em alimentos e água (DOMOTOROVA; MATISOVA, 2008), na área farmacêutica (ROCHELEAU; TITLEY; BOLDUC, 2004), química forense (CARDENIA et al., 2018) e na que determinação de ésteres em amostras biológicas (CRUZ-HERNANDEZ; DESTAILLATS, 2009), combustíveis ou na quantificação de ésteres alquílicos de ácidos graxos em amostras de biodiesel (RAGONESE et al., 2009).

Por meio da aplicação de taxas rápidas de aquecimento em combinação com uma coluna capilar mais curta e diâmetro interno reduzido (10 m x 0,18 mm) em GC/FID, os autores Rocheleau, Titley e Bolduc, 2004, obtiveram um ganho considerável em eficiência de separação e uma redução, de 15 min para 2,8 min, no tempo de resposta da análise de mais de 20 solventes residuais em substâncias farmacêuticas.

Domotorova e Matisova, 2008, demonstraram que o emprego de uma coluna de 10 m de comprimento e 0,10 mm de diâmetro interno em *Fast GC* com detecção fotométrica de chama (*flame photometric detection* – FDP), reduziu o tempo de análise de uma mistura de 18 pesticidas para 4,1 min, enquanto que, utilizando uma coluna com a mesma fase estacionária, 15 m x 0,15 mm diâmetro interno, a mesma análise apresentou um tempo total de 33 min.

Em 2018, Cardenia et al., desenvolveram e validaram uma metodologia baseada em *Fast GC-MS*, utilizando uma coluna de 10 m de comprimento e 0,10 mm de diâmetro interno, onde foram quantificadas 15 espécies de canabinóides extraídas da planta de Cânhamo (*Cannabis sativa*) em análises de 7 min.

Em 2009, surgiram definições para diferenciar os métodos *Fast GC* e *Ultra Fast GC* com base nos parâmetros instrumentais de análise. De acordo com Cruz-Hernandez e Destailats, 2009, *Fast GC* apresentava tempo de análise de 10 min, coluna com diâmetro interno entre 0,10 e 0,25 mm, comprimento de 5 - 15 m, taxas de aquecimento de 20 - 60 °C min⁻¹ e larguras de pico na faixa de 0,5 a 2 s, enquanto que, a análise em *Ultra Fast GC* tinha tempo de análise ≤ 1 min, em colunas curtas (2

- 10 m) com diâmetro interno de 0,005 a 0,10 mm, aquecimento acima de 1 °C s⁻¹ e larguras de pico entre 50 - 200 ms.

O aumento da velocidade de análise em GC tem se tornado objeto de pesquisa no mundo acadêmico em decorrência da otimização dos métodos e instrumentos cromatográficos, do desenvolvimento de novas fases estacionárias, colunas e *softwares* avançados para tratamentos de dados com a finalidade de tornar os resultados disponíveis em um curto intervalo de tempo e reduzir custos (SEQUINEL et al., 2010).

Os métodos que envolvem GC podem ser classificados em: GC convencional (GC-C), GC com coluna curta (GC-CC), GC rápido (GC-R) e GC ultra rápido (GC-UR), de acordo as com dimensões da coluna, tempo de análise, programação de temperatura e largura dos picos, (Tabela 2) (SEQUINEL et al., 2010).

Tabela 2: Classificação de metodologias baseada em GC.

Classificação	GC-UR	GC-R	GC-CC	GC-C
Comprimento coluna (m)	2 a 10	5 a 15	5	25 a 30
Diâmetro interno (mm)	0,05 a 0,10	0,10 a 0,25	0,25	0,25 a 0,32
Tempo de análise (min)	≤ 1	≤ 10	3 a 15	10 a 60
Taxa de aquecimento (°C min⁻¹)	≥ 60	15 a 60	5 a 40	1 a 10
Largura pico (s)	0,05 a 0,2	0,5 a 2	1 a 5	1 a 10

Fonte: SEQUINEL et al., 2010.

Segundo Matisova e Domotorova, 2003, a cromatografia rápida também pode ser classificada de acordo com o número de pratos tóricos, de maneira que, o *Fast GC* apresenta, no mínimo, a mesma quantidade de pratos teóricos que a técnica de

GC convencional, *very Fast GC* com 25.000 pratos teóricos e *ultra Fast GC* com 7.000 pratos teóricos.

Esta crescente demanda por análises de qualidade do biodiesel acompanha seu crescimento no mercado internacional. Portanto, é importante desenvolver métodos analíticos cada vez mais rápidos e confiáveis (TERCINI, et al., 2018). A Tabela 03 apresenta metodologias baseadas em GC convencional, *Fast GC* e *Ultra Fast GC* empregadas na análise de misturas de FAAE.

Ragonese et al., 2009, desenvolveram e validaram duas metodologias analíticas com base em GC/FID, sendo uma em GC convencional com coluna de polietilenoglicol (diâmetro interno de 0,20 mm) e outra baseada em *Fast GC* com coluna de 12 m de comprimento e diâmetro interno reduzido (0,10 mm) para determinação de FAMES em amostras de misturas diesel- biodiesel B20. O método de *Fast GC* demonstrou exatidão e eficiência semelhante ao convencional, além de reduzir o tempo de análise de 60 min para 2,6 min.

Marques et al., 2010, relataram o uso de oleato de etila como padrão interno em análise GC/FID para determinar o grau de pureza em FAMES de amostras de biodiesel metílico do óleo de soja e determinaram a exatidão do método comparando os resultados obtidos nas análises de FAME com a metodologia da norma EN14103.

Sato et al., 2016, empregaram GC/FID, utilizando a coluna com fase estacionária líquido-iônica para determinar FAMES em amostras de biodiesel obtido via transesterificação básica/ácida do óleo de soja, canola, milho, girassol e óleos utilizados no processo de fritura, aplicando o éster miristato de metila (C14:0) como padrão interno, visto que, o mesmo está presente abaixo de 0,5% m/m em amostras reais de biodiesel.

Hupp et al., 2018, empregaram um método de acordo com a norma ASTM D779 (indicado apenas para análise de diesel) estendendo-o a análise de misturas diesel- biodiesel utilizando UFGC/FID (*Ultra Fast GC*, ou GC ultrarrápido). Foi utilizada coluna com dimensões de 2 m × 0,32 mm × 0,2µm, onde misturas de biodiesel-diesel, sendo o biodiesel produzido a partir do óleo de soja, sebo, canola, açafrão, girassol, camelina, linhaça, entre outros, em concentrações de B0 a B20, foram analisadas em

5 min, porém, foram necessários mais 7 min com temperatura final constante para eliminação de componentes de alto peso molecular que podem estar presentes no biodiesel.

Tercini et al., 2018, desenvolveram e validaram uma metodologia alternativa de UFGC/FID, cromatografia gasosa ultra-rápida, acoplada ao módulo ultra- rápido para efetuar a análise total de FAMES em amostras comerciais de biodiesel com concentrações de 20 (B20) a 100% (B100) m/m, originárias de diferentes matérias-primas, tais como, babaçu, coco, colza, milho, gordura animal, óleo de palma, girassol e soja.

Os trabalhos supracitados nesta seção encontram-se na Tabela 3, na qual estão descritos os parâmetros instrumentais aplicados à cada metodologia para melhor visualização da otimização realizada em cada trabalho.

Tabela 3: Parâmetros instrumentais otimizados em trabalhos desenvolvidos com a técnica GC/FID para análise FAAE e biodiesel.

Referência	Metodologia	Fluxo do gás de arraste H ₂ (mL min ⁻¹)	Temperatura do injetor FID (°C)	Temperatura do detector (°C)	Dimensões da coluna	Fase estacionária	Razão split/splitless	Rampa de aquecimento do forno (°C)	Tempo (min)
RAGONESE et al., 2009.	Fast GC/FID	0,78	230	-	12 m × 0,10 mm × 0,08 µm	Polar	500:1	50 - 230 (70 °C min ⁻¹)	2,6
SATO et al., 2016.	Fast GC/FID	0,65	230	230	14 m × 0,10 mm × 0,08 µm	Polar	500:1	160	3,0
MARQUES et al., 2010.	GC/FID	-	220	-	30 m × 0,53 mm × 1 µm	-	splitless	250	6,0
HUPP et al., 2018.	UFGC/FID	-	350	350	2 m × 0,32 mm × 0,2 µm	Apolar	splitless	40 (10 s) 40 – 396 (2 °C min ⁻¹)	4,8
TERCINI et al., 2018.	UFGC/FID	1,00	250	260	10 m × 0,15 mm × 0,15 µm	Polar	100:1	60 (0,1 min) 60 – 180 (300 °C min ⁻¹) (0,2 min) 180 – 250 (500 °C min ⁻¹) (0,66 min)	1,5

Fonte: Autor, 2020.

3.3 Validação de métodos baseados em GC para análise de FAAE em biodiesel

O progressivo acréscimo de biodiesel no diesel convencional (ANP 2019), a importância de sua produção em vários países e a variedade de matérias-primas que podem ser empregadas na produção deste biocombustível, são fatores que influenciam estrategicamente o desenvolvimento, otimização e validação de métodos rápidos e economicamente atraentes para análise de ésteres alquílicos em biodiesel (SILVA et al., 2018).

Pardo et al., 2012, avaliaram características de desempenho analítico, tais como, limites de detecção e quantificação, linearidade, robustez, exatidão e precisão durante o desenvolvimento e validação de uma metodologia com GC, detecção por espectrometria de massa e ionização eletrônica de impacto, para análise de FAMES em amostras de biodiesel de óleo de tungue e misturas com biodiesel de soja.

Faria et al, 2007, desenvolveram e validaram uma metodologia para controlar a qualidade, estabilidade e condições adequadas de estocagem de misturas diesel – biodiesel produzido de óleos ricos em ácido linoleico (C18:2), utilizando GC-MS e padrão interno propanoato de n-pentadecanoíla (C15:0).

Morales et al., 2015, desenvolveram um método baseado em GCMS com diluição isotópica para a caracterização de FAMES selecionados incluindo C16:0 C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3 em biodiesel de colza e o validaram avaliando a linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão para resultados obtidos em dois laboratórios e em dias diferentes.

Braun et al., 2017, efetuaram a validação de um método analítico utilizando de GC/FID para estimar o teor de FAMES e FAEEs em biodiesel de soja e canola empregando acetato de hexadecil como padrão interno, de forma que foi empregada a norma EN14103 como método de referência para estudos comparativos e determinação da exatidão da metodologia proposta, além da avaliação de seletividade, repetibilidade, precisão intermediária e robustez.

Devido à limitação das normas EN14103:2003 e EN14103:2011, desenvolvidas para determinar o teor de FAMES do biodiesel que não apresenta heptadecanoato de metila (C17) e nonadecanoato de metila (C19), empregados como padrões internos, em sua composição, Pereira et al., 2018, desenvolveram e validaram uma metodologia fundamentada em GC/FID utilizando propanoato de hexadecil como um padrão interno (IS) para determinar FAMES em amostras de biodiesel de gordura bovina. Os seguintes parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária e robustez.

Silva et al., 2018, validaram um método baseado em GC/FID com coluna curta e fator de resposta aplicado a análise de FAMES em amostras de biodiesel do óleo de soja, etílico e metílico, estudando parâmetros de desempenho analíticos, tais como, sensibilidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, seletividade, precisão, robustez e exatidão, este último, avaliado através de ensaios de recuperação e comparação com outras metodologias.

A Tabela 4 indica as propriedades que foram avaliadas durante a validação da técnica de cromatografia gasosa nas metodologias das referências citadas no item 3.4 e, os parâmetros de desempenho analítico indicados pelo INMETRO.

Tabela 4: Comparação dos parâmetros de desempenho analítico estudados em algumas referências e as propriedades descritas pelo INMETRO (2018).

Parâmetro	Referências					
	PARDO et al., 2012.	MORALE S et al., 2015	BRAUN et al., 2017.	PEREIRA et al., 2018.	SILVA et al., 2018.	INMETRO, 2018.
Seletividade			X	X	X	X
Linearidade, faixa de trabalho, Faixa linear de trabalho, Sensibilidade	X	X			X	X
Limite de detecção	X	X			X	X
Limite de quantificação	X	X			X	X
Exatidão	X	X	X	X		X
Precisão	X	X	X	X	X	X
Robustez	X		X	X	X	X

Fonte: Autor, 2020.

3.4.1 Parâmetros de desempenho analítico

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que “a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”, enquanto o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) define a validação como a “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado método são atendidos” (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003; ABNT ISO/IEC, 2005).

A validação de método analítico fornece um documento que descreve o procedimento e assegura que uma metodologia analítica é precisa, seletiva, reprodutível e robusta em um intervalo específico de trabalho no qual o analito será analisado, garantindo assim, uma confiabilidade durante o uso contínuo do método em questão (SHABIR, 2003).

Os principais parâmetros de desempenho analítico definidos pela ANVISA e INMETRO para validar técnicas e metodologias de separação, são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação (THOMPSON, 2002; RIBANI et al., 2004; ARAUJO, 2009; INMETRO, 2011).

3.4.1.1 Seletividade

Um método seletivo, tem a capacidade de determinar, com precisão, uma substância na presença de outros analitos, potencialmente interferentes, constituintes de uma matriz complexa, isso é, a avaliação da seletividade fornece valores de quantidades medidos para vários analitos de forma que, a medida de cada analito é independente das demais presentes na amostra a ser investigada (INMETRO, 2018)

Desta forma, o aparelho de uma metodologia seletiva tem a capacidade de medir a potência do sinal analítico de um componente sem sofrer influência da perturbação por sinais de outros componentes com características semelhantes, possíveis impurezas, produtos de degradação da amostra entre outros (DEN BOEF; HULANICKI, 1983; THOMPSON, 2002; RIBANI et al., 2004; IVM, 2012).

A seletividade pode ser avaliada por meio de medidas do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais, ensaios com padrões ou materiais de referência, e, em termos GC, comparação dos cromatogramas obtidos de amostras com e sem o analito, comparação da resposta cromatográfica na identificação do analito de interesse na ausência e na presença de todas substâncias interferentes (ARAUJO, 2009; INMETRO, 2018).

3.4.1.2 Precisão

A precisão indica a dispersão de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob as mesmas condições, isto é, a precisão indica o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas com mesmo procedimento, no mesmo local, mesmo operador, mesmo instrumento, em um curto intervalo de tempo e é, geralmente, determinada pela repetitividade, precisão intermediária ou reprodutividade (RIBANI et al., 2004; MEIRA et al., 2015; INMETRO 2018).

A avaliação da precisão é uma das etapas decisivas durante o processo de validação de uma metodologia e é frequentemente expressa numericamente de três maneiras: pelo erro aleatório (grau de dispersão de um conjunto de medições individuais), pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) (ARAUJO, 2009; INMETRO, 2018).

3.4.1.3 Robustez

A robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação, muitas vezes estando mais associado a estudos de otimização, porém, este parâmetro de desempenho analítico avalia a coerência dos resultados quando os fatores internos, tais como taxa de fluxo, temperatura da coluna, o volume de injeção, composição da fase móvel ou qualquer outra variável inerente ao método de análise é variada deliberadamente (HARTMANN, 1998; INMETRO, 2018).

Estas mudanças instrumentais ou no preparo da amostra representam as variações que podem ocorrer quando um método é compartilhado entre, analistas, equipamentos ou laboratórios diferentes e, mede a sensibilidade que a técnica ou metodologia apresenta quando submetida a pequenas variações durante a aplicação

rotineira, de forma que, quanto mais robusto o método, maior o grau de confiança da reação entre sensibilidade e precisão (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2018).

Quanto a cromatografia, um método é robusto quando não apresenta variações significativas nos dados fornecidos em condições consideradas adequadas e quando submetido a variações limitadas em parâmetros como, a concentração do solvente orgânico, pH, força iônica do meio, programação da temperatura, natureza do gás de arraste, bem como o tempo de extração e agitação. (RIBANI et al., 2004).

3.4.1.4 Exatidão

A exatidão é considerada a propriedade mais importante durante a realização de testes experimentais com metodologias analíticas e é definida como o grau de proximidade entre os valores obtidos com o método a validar e os dados considerados verdadeiros, gerados a partir de uma metodologia de referência, em toda faixa de concentração do analito de interesse em que se pretende validar o método (MILLER, 2010; INMETRO 2018).

Além da comparação do método proposto com um método de referência, a exatidão também pode ser avaliada por meio da utilização de material de referência certificado ou de ensaios de recuperação a fim de, verificar a influência de fatores como a precisão do método e a habilidade do operado sobre a variabilidade dos resultados (FEINBERG, 2007; MEIRA et al., 2015).

Quando analisada por meio de estudos de adição e recuperação, a exatidão é estabelecida com um mínimo de nove determinações envolvendo o mínimo três níveis de concentração diferentes, ou seja, ensaios em triplicada para cada um dos três níveis de concentração (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008; MEIRA et al., 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e material

A Tabela 5 apresenta os reagentes e materiais graxos utilizados na produção de ésteres metílicos e no preparo das amostras para efetuar as análises em técnicas GC e RMN ^1H durante o desenvolvimento do projeto.

Foram utilizados óleos comerciais, com exceção do óleo residual de fritura, fornecido por um restaurante localizado na Universidade Federal de Alagoas, óleo de gergelim e da gordura de frango, fornecidos pelo Laboratório de Sistemas de Separação e Otimização de Processos (LASSOP/UFAL) e óleo da polpa de mamona, obtido na Cooper Riachão (Mirabela/ Minas Gerais).

Em parceria com o LASSOP, a gordura de frango foi obtida através da seguinte metodologia: os resíduos foram moídos, para facilitar a extração do óleo, e em seguida foram colocados em um recipiente com água, na proporção de 2 litros de água para cada quilograma de gordura. Esta mistura foi levada à fervura por 4 horas e em seguida foi filtrada com o auxílio de um sistema a vácuo. O filtrado foi depositado em um funil de decantação para efetuar a separação das fases, oleosa e aquosa. Em seguida aqueceu-se a fase oleosa e filtrou-se novamente em peneira fina. Posteriormente, filtrou-se o óleo sob vácuo, de modo a remover quaisquer partículas residuais. Por fim, este óleo foi levado para a estufa afim de retirar quaisquer resíduos de água. O óleo de macaúba foi obtido por prensagem a frio seguida por uma filtração.

Tabela 5: Reagentes empregados na produção de biodiesel e no preparo das amostras.

Reagentes	Pureza	Fornecedor
Ácido fosfórico	PA	Êxodo Científica
Álcool metílico	PA	Dinâmica
Álcool Isopropílico (2-propanol)	> 99,5 %	Dinâmica
	Grau HPLC	TEDIA
Hexano	> 98,5 %	Dinâmica
Hidróxido de sódio sólido	PA	Dinâmica
Cloreto de sódio sólido	PA	VETEC
Heptano	> 99,5%	Dinâmica
Toluol	> 99,5%	Dinâmica
Óleo de Algodão	Refinado	Bunge Alimentos
Óleo de Canola	Refinado	Bunge Alimentos
Óleo de Coco	Refinado	Sococo
Óleo de Dendê	Refinado	Cepêra
Óleo de Gergelim	-	LASSOP – UFAL
Óleo de Girassol	Refinado	Bunge Alimentos
Gordura de frango	-	LASSOP – UFAL
Óleo de Mamona	Refinado	Sucroquímica
Óleo de Milho	Refinado	Bunge Alimentos
Óleo de Soja	Refinado	Bunge Alimentos
Óleo de Macaúba	-	Cooper Riachão
Óleo de Chia	Refinado	Giroil
Óleo de Amendoim	Refinado	Pazze
Óleo de Amêndoa	Refinado	Pazze
Óleo de Fritura	-	Restaurantes
Trioctanoato de glicerila (Tricaprilina)	> 99,0 %	Sigma
Heptadecanoato de metila	> 99,0 %	Sigma
Clorofórmio deuterado	≥ 99,8%	Sigma

Fonte: Autor, 2020.

4.2 Produção de amostras de biodiesel padrão B100 (100% FAMES)

Na Primeira etapa do desenvolvimento do projeto, foram produzidas amostras padrões de biodiesel B100, isto é, amostras com 100% em teor de ésteres metílicos. Foram realizadas reações de transesterificação alcalina (NaOH) com álcool metílico e diferentes tipos de matérias-primas: soja, algodão, canola, coco, dendê, gergelim,

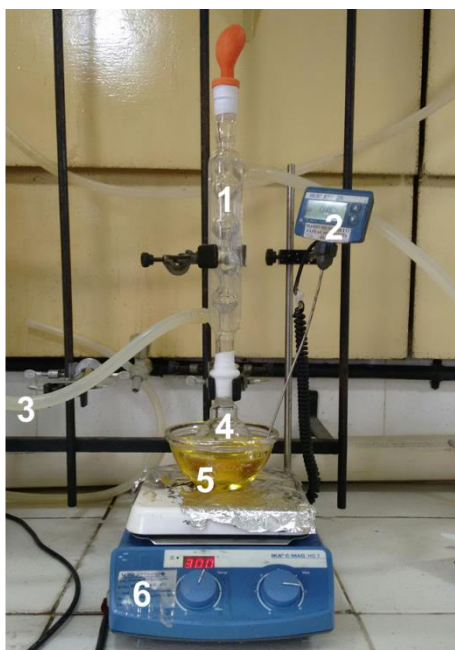
girassol, gordura de frango, mamona, milho, macaúba, amêndoa, amendoim, chia e óleo residual de fritura.

As amostras de biodiesel metílico e B100 foram obtidas empregando as melhores condições para a reação de transesterificação: proporção molar 01:06:0,2 (óleo:álcool:catalisador); temperatura constante de 60 °C, e hidróxido de sódio foi empregado como catalisador (MENEGETTI et al., 2015b). Devido à elevada viscosidade e acidez do óleo de mamona, a razão molar empregada na produção do B100 de óleo de mamona foi 01:09:0,2 (óleo:álcool:catalisador), conservando os demais parâmetros reacionais.

A Figura 5 apresenta a configuração do sistema reacional fechado, no qual, foram realizadas as reações de transesterificação. Este sistema contém um balão de 150 mL acoplado ao condensador com aparelho de refrigeração, sob agitação magnética, (IKA, China) (aproximadamente 100 rpm) e aquecimento em banho de óleo com temperatura constante e monitorada por um termopar (IKA, China). As massas dos reagentes foram medidas em uma balança analítica com quatro casas decimais, modelo AX200, Shimadzu (Quioto, Japão).

Ao finalizar o processo reacional, os produtos (biodiesel e glicerol) foram depositados em funis de decantação para efetuar a respectiva separação. O biodiesel isolado foi neutralizado com o acréscimo de solução aquosa de ácido fosfórico 5% (v/v) e, em seguida, foi tratado com solução aquosa de cloreto de sódio (50 g/L) até obter um biodiesel com pH próximo à 7,0. Foi medido o pH do biodiesel e do meio aquoso após lavagem utilizando fita universal medidora de pH (MERCK, Alemanha).

Figura 5: Sistema reacional empregado nas reações de transesterificação (1- condensador; 2- termopar; 3- sistema de refrigeração; 4- balão volumétrico; 5- banho de óleo; 6- sistema de aquecimento e agitação).

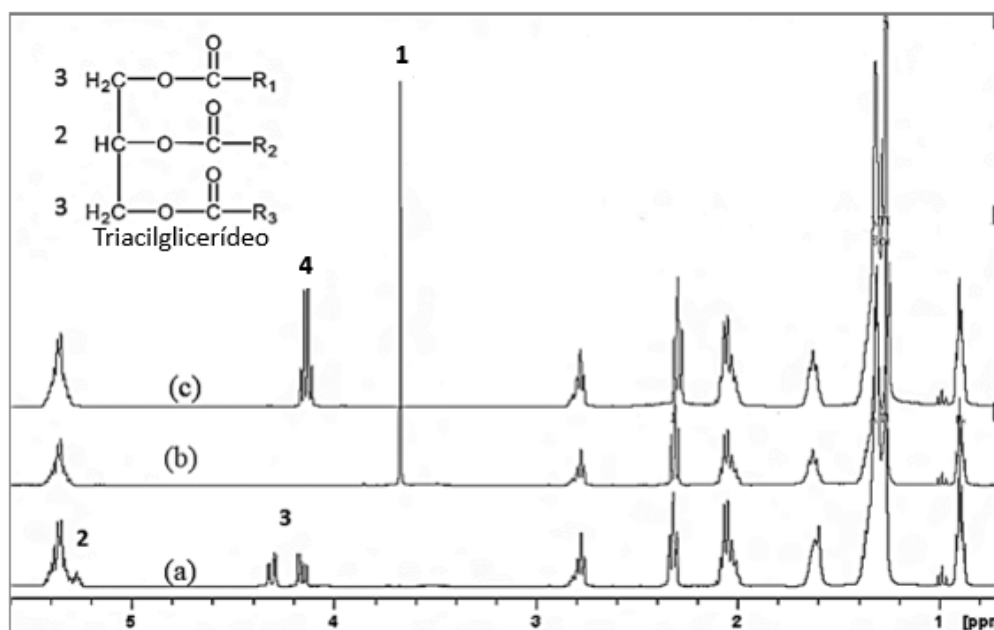


Fonte: Autor, 2020.

4.3 Comprovação da conversão total de TAG em FAME (biodiesel B100)

A técnica de RMN ^1H , Figura 6, foi aplicada ao monitoramento da conversão total dos triacilglicerídeos constituintes de todos os materiais graxos empregados na produção de B100. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados no espectrômetro Bruker DRX-400 (Billerica, EUA). Foi pesada uma massa igual à 0,2 g de biodiesel a qual foi dissolvida em 0,5 mL de clorofórmio deuterado.

Figura 6: Espectros de RMN 1H para monitoramento da reação de transesterificação do óleo de soja.



Fonte: Adaptado de MENEGHETTI et al., 2015a.

Nota: Espectros em clorofórmio deuterado: (a) óleo de soja refinado; (b) biodiesel metílico de soja; (c) biodiesel etílico de soja; Sinais de prótons: 1 – ésteres metílicos (3,6 ppm); 2 (5,27 ppm) e 3 e (4,1 – 4,35 ppm) – prótons glicéricos; e 4 – ésteres etílicos (4,1 ppm).

Conforme demonstra a Figura 6, os sinais (2 e 3) referentes aos triacilglicerídeos são observados na análise do óleo de soja, porém, estes sinais desaparecem após a reação de transesterificação do óleo de soja. Quando se obtém uma conversão total dos triacilglicerídeos em ésteres alquílicos, é possível observar o sinal 1, referente aos ésteres metílicos (3,6 ppm), e um sinal 4, referente aos ésteres etílicos (4.1 - 4.35 ppm) nos espectros indicando que o biodiesel apresenta 100% em rendimento (MENEGHETTI et al., 2015a).

A conversão da reação de transesterificação foi determinada utilizando o programa *NMR TopSpin 3.6.2* (BRUKER, 2019) com base nas áreas dos sinais selecionado, conformes a equação 02:

$$Y\% = 100 \times \left(\frac{2A_1}{3A_2} \right) \quad (02)$$

Onde A_1 e A_2 são as áreas dos sinais dos prótons do grupo metóxido dos ésteres metílicos de ácidos graxos (3,7 ppm) e do grupo (2,3 ppm), respectivamente (GELBARD et al., 1995).

4.4 Caracterização dos materiais graxos

As amostras de B100 de cada matéria-prima foram empregadas na caracterização de óleos e gorduras em relação à composição em ácidos graxos para posteriormente calcular a massa molar dos triacilglicerídeos de cada material graxo, necessária para determinar a proporção molar óleo/gordura:álcool:catalisador.

Por meio dos Métodos Oficiais de Análise Ce1-62 e Ce2-26 (Firestone,1998), , as amostras B100 foram analisadas por cromatografia gasosa (GC), onde dissolve-se, aproximadamente, 0,0500 g em da amostra em 1,0 mL de heptano. Foi empregado o cromatógrafo, modelo GC-2010/Shimadzu, equipado com um sistema de injeção split/splitless operando a 250°C, razão de split de 100:1, volume de injeção de amostra de 1,0 µL e detector de ionização em chama (FID) operando a 250°C. Foi empregada uma coluna capilar polar ZB-WAXplus/Phenomenex (Torrance, EUA) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filma e gás hidrogênio, como gás de arraste, com alta pureza (99,95% LINDE). A programação da temperatura do forno e coluna foi a seguinte: 160 – 225 °C (15°C min⁻¹), 225 – 245°C (3°C min⁻¹), de modo que, o tempo total de análise foi de 11 min.

A composição em ácidos graxos foi calculada identificando os respectivos ésteres metílicos de ácidos graxos nos cromatogramas obtidos, com base nos tempos de retenção dos padrões analíticos de ésteres de ácidos graxos, presentes em duas misturas de padrões analíticos (mistura 1 e 2) analisadas na mesma metodologia. Após a identificação dos picos para cada éster, as áreas foram normalizadas para caracterizar cada tipo de matéria-prima. A mistura 1 contém C14:0-C18:3 (2%-C14, 30%-C16, 3%-C16:1, 14%-C18, 41%-C18:1, 7%-C18:2, 3%C18:3) e a mistura 2 é constituída por C16:0-C20:0 (6%-C16, 3%-C18, 35%-C18:1, 50%C18:2, 3%-C18:3, 3%-C20:0), m/v (Sigma Aldrich. São Paulo, Brazil). A quantificação em termos de

porcentagem em massa para cada ácido graxo é calculada por meio da integração das áreas dos picos e normalização.

4.5 Produção das amostras de biodiesel em diferentes intervalos de teor de FAME para todos os tipos de materiais graxos

Utilizando todos os materiais graxos citados na primeira etapa experimental, foram realizadas reações de transesterificação em diferentes condições reacionais, (Tabela 6), para obter amostras de biodiesel em cinco faixas de concentração em ésteres metílicos: < 20%ésteres, 20% - 40%ésteres, 40% - 60%ésteres, 60 - 80%ésteres, 80 - 100%ésteres.

A Tabela 6 demonstra as condições reacionais que foram aplicadas na reação de transesterificação metílica do óleo de soja em estudos anteriores. Como cada material graxo apresenta suas propriedades físico-químicas específicas, quando não obtido o rendimento em éster dentro das faixas de estudo, uma segunda reação foi realizada, com os produtos da primeira reação.

Tabela 6: Condições reacionais adotadas na produção das amostras de biodiesel nas cinco faixas de concentração (%massa).

Temperatura (°C)	Proporção molar óleo:MeOH	NaOH (g)	Tempo (min)	Rendimento em monoésteres (%massa)
40	1:1	10	15	5
40	1:1	5	30	34
60	1:2	5	30	55
40	1:3	5	30	74
60	1:3	10	30	98

Fonte: MENEGHETTI et al., 2015b.

Após a reação de transesterificação, os produtos reacionais foram tratados de acordo com o mesmo procedimento adotado na produção de amostras B100. Em seguida foram analisados no método proposto utilizando a técnica de *Fast GCRF* e nos dois métodos de referência (itens 5.9.4.1 e 4.9.4.2) para realizar a comparação no estudo de exatidão do método durante o processo de validação.

4.6 Identificação de interferentes por meio da técnica de espectrometria de massas

As amostras de biodiesel, obtidas após os diversos procedimentos de purificação foram analisadas em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC - MS) para identificar os possíveis interferentes e impurezas presentes nas amostras e observados nos cromatogramas obtidos com o método GCSCRF.

Foi utilizado um equipamento GC/ Shimadzu (Quioto, Japão), operando com injetor à 250°C, modo split 50:1, gás hélio num fluxo de 2,0 mL/min. Foi empregada a coluna RTX 5ms (Restek, Estados Unidos) a qual, apresenta baixa polaridade, 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A temperatura inicial do forno foi igual a 50°C, permanecendo durante 1min, e seguida uma programação de temperatura de forma que, o forno foi aquecido até 180°C por 15°C min⁻¹, em seguida aquecido de 180°C a 230°C por 7°C min⁻¹ e em seguida, aquecido até 340°C por 30°C min⁻¹, permanecendo em 340°C por 5min. O tempo total de análise foi igual à 25,48min, com corte de solvente de 5 min.

Quanto ao espectrômetro de massas, este foi utilizado no modo varredura scan, com a temperatura da interface igual a 300°C, temperatura da fonte de íons 300°C e impacto de elétrons de 70 V.

4.7 Purificação das amostras de biodiesel

Silva et al., 2018, validaram o método de GC com coluna curta e fator de resposta (GCSCRF) utilizando biodiesel padrão B100 produzido a partir do óleo de soja. Neste trabalho, o método de GCSCRF foi adotado como metodologia de

comparação 02 e, antes de utilizar a metodologia de *Fast GCRF* proposta neste trabalho, foi necessária a aplicação do método *GCSCRF* para analisar biodiesel produzido a partir de outras matérias-primas. Os resultados obtidos foram comparados com as análises das mesmas amostras utilizando o método de referência 01, norma EN14103 (2011).

Durante a aplicação do método de comparação 02 (SILVA et al., 2018; ANEXO 2), os cromatogramas de alguns tipos de biodiesel demonstraram picos em menores quantidades e em tempos de retenção diferentes dos analitos de interesse. Com isso foram realizadas algumas etapas de purificação das amostras com a finalidade de eliminar estes compostos relacionados a possíveis interferentes ou impurezas.

As amostras foram tratadas por diferentes metodologias para purificação, tais como: esterificação seguida da transesterificação, filtração em coluna com carvão ativado e sílica, extração com alumina sob agitação e lavagem com solução de NaCl à 60°C.

4.8 Desenvolvimento da metodologia proposta: *Fast GCRF* com fator de resposta

A determinação do rendimento reacional em termos de ésteres metílicos foi realizada utilizando a técnica de *Fast GCRF*, isto é, empregando uma coluna cromatográfica com diâmetro interno e comprimento reduzidos com a finalidade de diminuir o tempo total de análise. Este método foi baseado em outra metodologia com coluna curta e fator de resposta validada no laboratório (SILVA et al., 2018), porém, variando alguns parâmetros de análise tais como, rampa de temperatura, coluna cromatográfica, fluxo do gás de arraste e instrumento.

O instrumento empregado é o modelo GC-2010/ Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com um sistema de injeção capilar split/splitless operando a 340°C, razão de split de 80:1, volume de injeção de amostra de 1,0 µL e detector de ionização em chama (FID) operando a 360°C. Foi empregada uma coluna capilar apolar VZB-1ms (Zebron, Estados Unidos), com 10 m de comprimento, 0,10 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,10 µm. Foi utilizado o gás hidrogênio de alta pureza (99,95%

Linde) como gás de arraste com fluxo 1,2 mL/min. A programação de temperatura do forno otimizada foi: temperatura inicial de 60°C; aquecimento de 60 °C min⁻¹ até 360 °C, com tempo total de 5 min. O rendimento em ésteres de ácidos graxos (R%) foi quantificado na presença de trioctanoato de glicerila (tricaprilina), que foi utilizado como padrão interno (PI).

O preparo das amostras foi semelhante ao método de comparação GCSCRF no qual foi pesada a massa de aproximadamente 0,15 g dos produtos obtidos na alcoólise dos materiais graxos em um balão volumétrico de 1,00 mL. Em seguida, adicionou-se a massa (0,08 g) de trioctanoato de glicerila (PI) e completou-se o balão com hexano. O rendimento em ésteres metílicos (R%) foi calculado pela equação 03:

$$\%R = \frac{m_{PI} \times A_S \times F}{A_{PI} \times m_S} \times 100 \quad (03)$$

Onde: m_{PI} é a massa do padrão interno (0,08 g de trioctanoato de glicerila), A_S é a soma das áreas dos picos referentes aos ésteres contidos na amostra (picos detectados entre 5 min e 8 min), F é o fator de resposta do biodiesel de soja metílico, A_{PI} é a área do pico referente ao padrão interno - Tricaprilina - pico detectado entre 10 min e 14 min) e m_S é o peso da amostra.

As análises de amostras de biodiesel, de diferentes tipos de matérias-primas e com diferentes concentrações em ésteres metílicos totais, foram realizadas em triplicata.

As amostras de biodiesel B100 foram analisadas, em triplicata, no método proposto para calcular o fator de resposta, o qual foi aplicado como fator de correção do detector. O fator de resposta foi determinado para cada tipo de material graxo utilizado na produção de biodiesel de forma que, o fator de resposta foi calculado no mesmo dia de análise do respectivo tipo de biodiesel.

4.9 Validação da metodologia proposta: *Fast GCRF* com fator de resposta

A metodologia de *Fast GCRF* com fator de resposta foi validada avaliando os parâmetros de seletividade, precisão (intra-ensaio e instrumental), robustez (variação no preparo de amostra, instrumento, analista e dia de análise) e exatidão (comparação de métodos e ensaio de recuperação), baseando-se nos procedimentos indicados pelo INMETRO e em algumas publicações (RIBANI et al., 2004; VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008; INMETRO, 2018; SILVA et al., 2018).

4.9.1 Seletividade

A seletividade do método proposto, foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos para cada tipo de B100 e cromatograma do solvente empregado no preparo da amostra. Ao efetuar esta comparação, foi possível verificar a capacidade do método em separar, identificar e quantificar os analitos na presença de possíveis interferentes e impurezas oriundas do material graxo de partida.

Outra propriedade avaliada foi o fator de seletividade entre os picos dos analitos de acordo com a equação 04:

$$\gamma = \frac{t_{RB}}{t_{RA}} \quad (04)$$

Onde t_{RB} e t_{RA} são os tempos de retenção dos picos consecutivos observado no cromatograma, sendo $t_{RA} < t_{RB}$ (HARRIS, 2008).

4.9.2 Precisão

Para o estudo da precisão do método, foram fixados, o analista e o instrumento nas mesmas condições, a avaliação destes parâmetros foi realizada em um único dia e aplicando os seguintes métodos:

- I. Precisão instrumental – Cada amostra de diferente tipo de biodiesel e faixa de concentração, foi preparada uma única vez e analisada 10 vezes nas mesmas condições, mesmo equipamento e mesmo analista.

- II. Repetitividade (Intra- ensaio) – foram empregadas três amostras de diferentes tipos de biodiesel com diferentes faixas de concentração, nas quais foram feitas 10 medidas em diferentes preparações da amostra.
- III. Precisão intermediária – três amostras de diferentes tipos de biodiesel foram analisadas 10 vezes por um segundo analista e em dia diferente ao dia da precisão instrumental e repetitividade.

Nos estudos I, II e III, a precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD – *Relative Standard Deviation*) calculado de acordo com a equação 05:

$$RSD = \frac{s}{CMD} \times 100 \quad (05)$$

Onde, s é o desvio padrão de todas as análises realizadas para cada metodologia; CMD é a concentração média determinada (INMETRO, 2011), neste caso, o rendimento percentual em ésteres metílicos do biodiesel de soja.

Os resultados de RSD são expressos em porcentagens e podem significar: a homogeneidade entre os dados da amostra (0% a 10%); a homogeneidade mediana entre os dados (10% a 20%); dados medianamente heterogêneos (20% a 30%); e dados significativamente heterogêneos ($RSD > 30\%$) (TIMBÓ, 2014).

As técnicas analíticas que quantificam compostos em macro quantidades admitem um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, dependendo da complexidade da amostra, são aceitos valores de RSD de até 20% (RIBANI et al., 2004).

5.9.2.1 Aplicação do teste de *Grubbs*

No estudo da precisão do método *Fast GCRF*, foi aplicado o teste de rejeição de dados, Teste de Grubbs, o qual rejeita valores em relação a estimativa do desvio padrão (SD). Este teste de confiança observa valores dispersos anormais maiores ou menores, que aparecem no grupo de medidas.

De acordo com Leite (2008), a aplicação do teste de *Grubbs*, foi realizada seguindo as seguintes etapas:

- i- Os valores obtidos foram colocados em ordem crescente;
- ii- foi calculada a média aritmética;
- iii- O maior valor do conjunto de medidas foi testado de acordo a equação 06:

$$G = \frac{(X_{maior} - \bar{X})}{SD} \quad (06)$$

Onde: X_{maior} é a medida de maior valor; $\bar{X}$ é a média aritmética; SD é o desvio padrão.

- iv- O menor valor do conjunto de medidas foi testado de acordo a equação 07:

$$G = \frac{(\bar{X} - X_{menor})}{SD} \quad (07)$$

- v- Os valores de G , dos testes descritos em iii e iv, foram comparados com os valores críticos tabelados, a 95% de confiança.
- vi- Quando $G > G\%$, o a medida de maior valor foi rejeitada.
- vii- Se maior valor não foi rejeitado, o menor valor foi testado; de o maior valor foi rejeitado, foi determinada uma nova média e testado o menor valor do conjunto.
- viii- Os procedimentos descritos de i – vii, foram repetidos até que o maior e menor valores foram aceitos, isto é, se o menor valor para a nova amplitude foi aceito, a maior valor foi testado pra mesma média.

4.9.3 Robustez

O estudo da robustez foi realizado para avaliar a sensibilidade e estabilidade dos resultados gerados pelo método de *Fast* GCRF com fator de resposta quando submetido as seguintes variações no preparo de amostra:

- I. Mudança do solvente: o hexano, solvente utilizado no procedimento de preparo da amostra para a análise cromatográfica, foi alternado por uma mistura 50:50

v/v de álcool isopropílico (2-propanol) e toluol (solventes comumente empregados na determinação do índice de acidez de acordo com a norma americana ASTM D664-11).

- II. Variação na força iônica do meio: adição de cloreto de sódio no preparo de amostra.

4.9.4 Exatidão - Comparação de metodologias

Os resultados gerados no método de *Fast* GCRF foram comparados com duas metodologias de comparação – EN 14103 (método 01) (ANP, 2014; EN 14103, 2011) e cromatografia gasosa com coluna curta e fator de resposta GCSCRF (método 02) (Silva, 2018) – e calculado o valor do coeficiente de determinação, r^2 .

As amostras de biodiesel foram analisadas em triplicata em cada uma das metodologias e no mesmo dia de análise, isto é, a amostra de determinado tipo e concentração de ésteres totais, foi injetada nos três métodos durante o mesmo dia de análise.

5.9.4.1 Método de referência 01: Norma Europeia 14103

O método prescrito pela norma europeia EN 14103, indicado na Resolução da ANP de número 45 de 2014 para quantificação de ésteres metílicos no biodiesel, foi empregado para uma análise comparativa dos resultados obtidos com a metodologia de coluna curta.

Nesta metodologia, foi dissolvido, aproximadamente, 0,0500 g da amostra de biodiesel em 1,0 mL da solução de heptadecanoato de metila (C17:0) em heptano de grau analítico (0,01 g/mL). Foi empregando um instrumento GC-2010/Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com um sistema de injeção split/spliteless operando a 250 °C, razão de split de 100:1, volume de amostra de 1,0 µL e detector de ionização em chama (FID) operando a 250°C. Para o uso desta metodologia foi empregada uma coluna capilar polar ZB-WAXplus/Phenomenex (Torrance, EUA) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme e gás hidrogênio, de alta pureza (99,95% Linde), usado como gás de arraste. A temperatura inicial da coluna foi 60°C durante 2 min, em seguida elevada até 200°C (10°C min⁻¹)

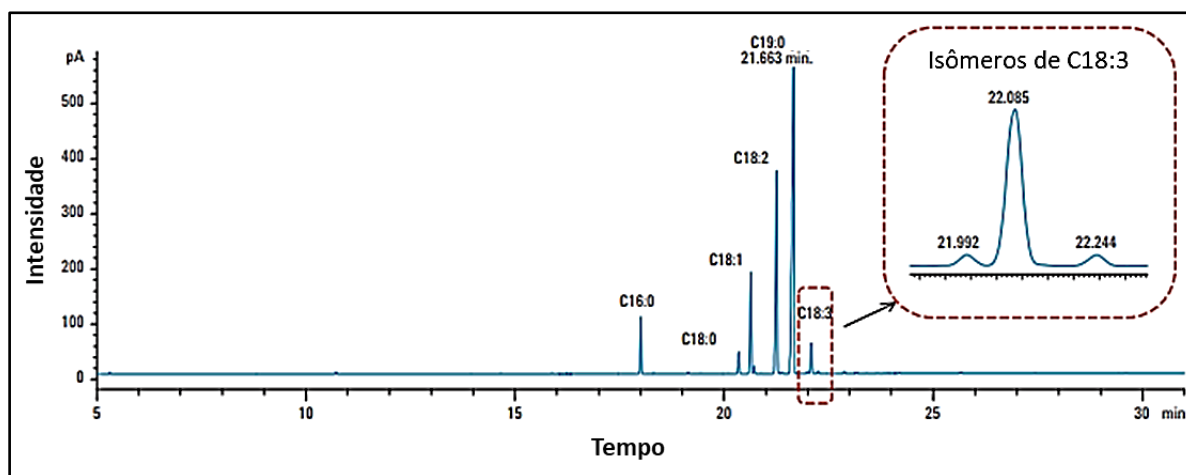
e novamente elevada até 240°C (5°C min⁻¹), permanecendo nesta última por 7min, totalizando um tempo de análise de 31 min. A composição em ésteres metílicos foi calculada a partir da equação 08:

$$C = \frac{(\sum A_B) - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{M_B} \times 100 \quad (08)$$

Onde, A_B é a área total dos picos correspondentes ao biodiesel; A_{PI} (C17:0) é a área do pico correspondente ao padrão interno heptadecanoato de metila; C_{PI} é a concentração, em mg/mL, da solução do padrão interno; V_{PI} é o volume da solução do padrão interno; e M_B é a massa pesada do biodiesel, em mg (EN 14103, 2011; RANP 45, 2014).

A Figura 7 representa um exemplo de cromatograma obtido pela análise de biodiesel metílico de colza empregando a metodologia EN 14103.

Figura 7: Cromatograma da análise de uma mistura ésteres metílicos do biodiesel de soja pelo método GC EN 14103:2011.



Fonte: Adaptado de MCCURRY, 2012.

Nota: Ésteres de ácido graxo: C16:0 - palmítico; C18:0 - esteárico; C18:1 – oleico; C19:0 - nonadecanoato de metila (padrão interno); C18:2 - linolêico, C18:3 – linolênico.

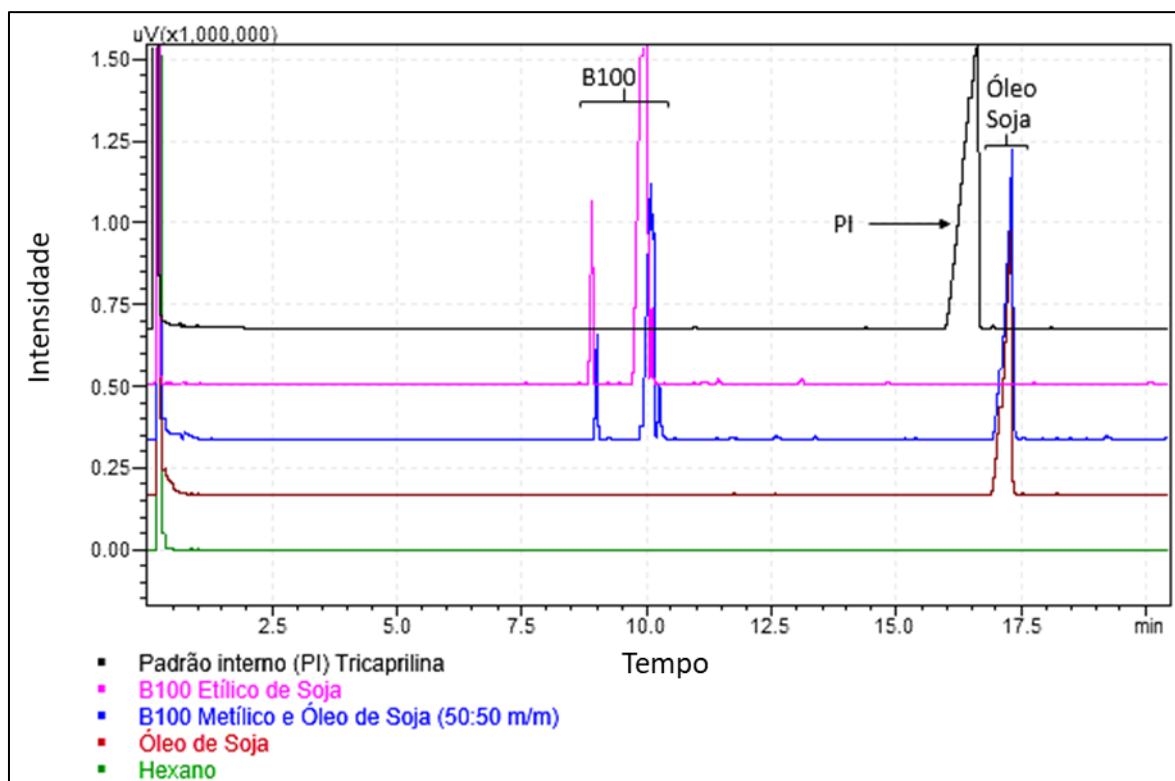
5.9.4.2 Método comparativo 02: Cromatografia gasosa de coluna curta com fator de resposta – GCSCRF

O GCSCRF foi validado no laboratório de catálise e reatividade química e tem sido empregado na quantificação de ésteres metílicos e etílico de óleo de soja com ampla faixa de concentração. Este método com coluna curta e fator de resposta é a base do método de *Fast* GCRF com fator de resposta, isto é, o método proposto neste projeto é a otimização da metodologia GCSCRF.

Na metodologia GCSCRF (SILVA et al., 2018; ANEXO 2) foi empregado um instrumento GC-2010/ Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com um sistema de injeção capilar split/splitless operando a 240°C, razão de split de 80:1, volume de injeção de amostra de 1,0 µL e detector de ionização em chama (FID) operando a 250°C. Foi empregada uma coluna capilar apolar VF-1ms (Factor Four), com 2,2 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme com 0,25 µm de espessura e gás hidrogênio, de alta pureza (99,95 % Linde), usado como gás de arraste. A programação de temperatura foi: temperatura inicial de 50°C (1 min); aquecimento de 50°C até 180°C, a uma taxa de 15 °C min⁻¹; aquecimento de 180°C até 230°C, a uma taxa de 7°C min⁻¹; aquecimento de 230°C até 340°C, a uma taxa de 30°C min⁻¹. O tempo total de análise foi de, aproximadamente, 21 minutos. O rendimento em ésteres de ácidos graxos (R%) foi quantificado na presença de trioctanoato de glicerila (tricaprilina), que foi usado como padrão interno. Aproximadamente 0,15 g dos produtos obtidos na alcoólise dos óleos vegetais foram pesados em um balão volumétrico de 1 mL. Em seguida, adicionou-se a massa (0,08 g) de trioctanoato de glicerila e completou-se o balão com hexano. O teor percentual em ésteres metílicos foi calculado de forma idêntica a metodologia de *Fast* GCRF com fator de resposta, equação 08.

Na Figura 8 estão apresentados alguns cromatogramas obtidos com a metodologia GCSCRF

Figura 8: Cromatogramas de análises realizadas no método GCSCRF.



Fonte: Autor, 2016.

5.9.4.3 Aplicação do teste estatístico ANOVA

O método de *Fast GC* e o método comparativo, GCSCRF, foram validados por meio do estudo da exatidão, quando comparados ao método de referência da Norma 14103.

Foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) a nível de confiança de 95% para verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos com os três métodos em todas as faixas de concentração. Sendo a hipótese nula, $H_0: \mu_{\text{Fast GC}} = \mu_{\text{GCSCRF}} = \mu_{\text{NORMA 14103}}$; e a hipótese alternativa, H_0 : pelo menos dois μ_i são diferentes; onde μ = média populacional (TIMBÓ, 2014).

4.9.5 Exatidão – Ensaios de recuperação

O estudo de recuperação foi realizado com três amostras de diferentes tipos de biodiesel e diferentes concentração de ésteres metílicos, de forma que, cada amostra foi fortificada em três níveis de fortificação com B100 dos respectivos tipos de

biodiesel. Cada amostra fortificada foi analisada em triplicata e o percentual de recuperação foi determinado de acordo com a equação 09:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (09)$$

Onde: C_1 é a concentração determinada na amostra fortificada; C_2 é a concentração determinada na amostra não fortificada; e C_3 = concentração adicionada (INMETRO, 2011).

Segundo RIBANI et al. (2004), as faixas de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. No caso de amostras com maior complexidade analítica, este intervalo pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$.

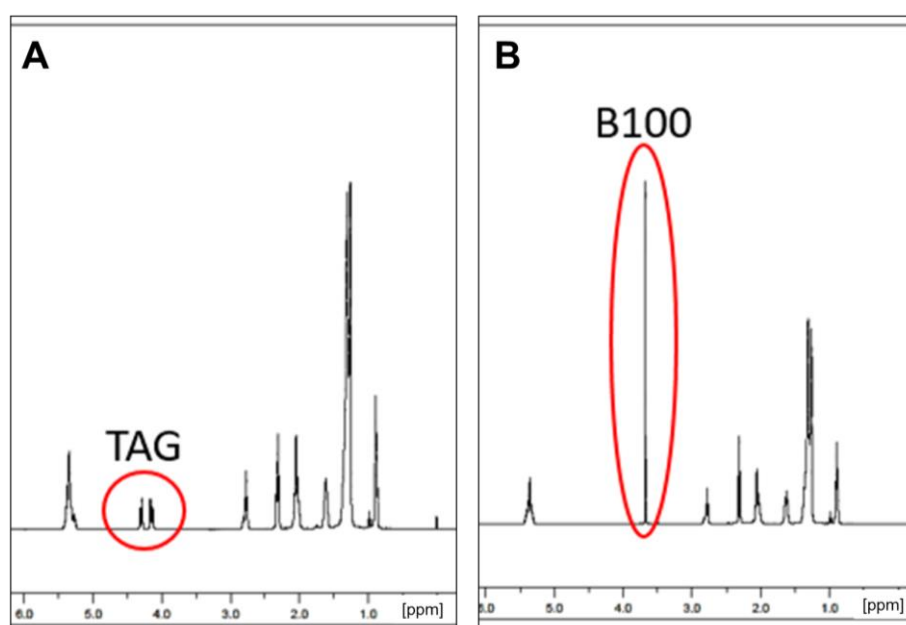
Como regra geral, as recuperações da maioria dos compostos fortificados nas amostras devem ficar na faixa de 70% a 130%, e essa faixa deve ser usada como critério de aceitação para avaliação do desempenho interno no controle de amostras no laboratório (EPA, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos padrões de biodiesel por RMN ^1H

A caracterização dos padrões de biodiesel, oriundo de todas as matérias-primas, foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Na Figura 9 estão apresentados os espectros de RMN ^1H obtidos para o óleo de soja e o biodiesel metílico padrão de óleo de soja, respectivamente.

Figura 9: Espectros de RMN ^1H obtidos para o óleo de soja e para o biodiesel de soja metílico – 99,32%_{FAME}.



Fonte: Autor, 2020.

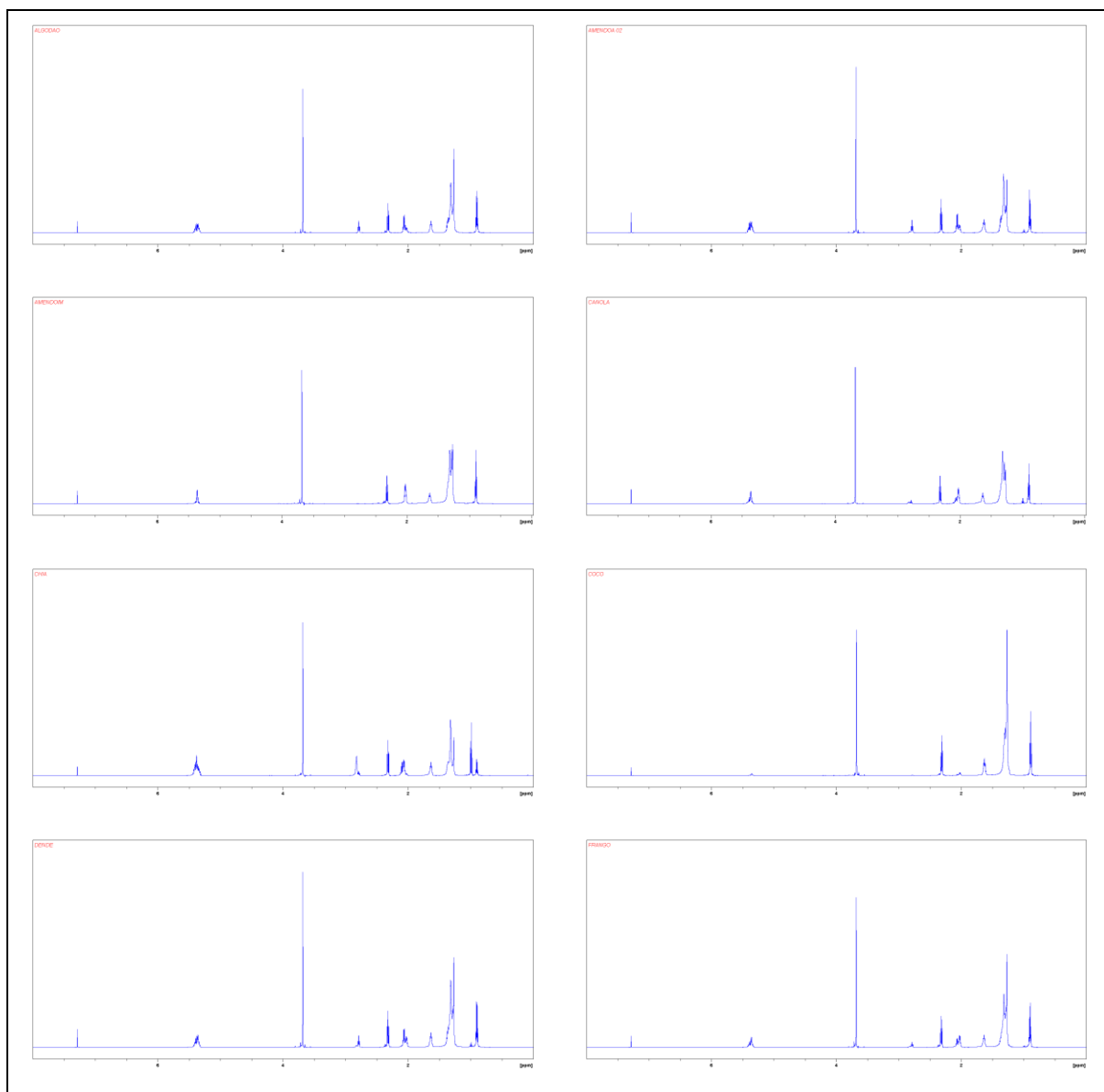
Nota: Espectro A – Amostra do óleo de soja (TAG – triacilglicerídeos); Espectro B- Biodiesel de soja (B100: Biodiesel 100% em ésteres metílicos).

Por meio da análise dos espectros na Figura 9, é possível identificar a total conversão dos triacilglicerídeos, presentes no óleo de soja, em ésteres metílicos, visto que, se observa o desaparecimento dos sinais referentes aos prótons glicéricos (TAG – 4,1 - 4,35ppm) e o surgimento do sinal dos prótons de FAME do B100 em aproximadamente 3,6 ppm.

Nas Figuras 10 e 11 estão apresentados os espectros de RMN ^1H para as amostras B100 dos óleos de algodão, amêndoa, amendoim, canola, chia, coco,

dendê, gordura de frango, residual de fritura, gergelim, girassol, macaúba, mamona e milho com conversões acima de 96,5%, conversão mínima estabelecida na resolução N° 45 ANP de 2014.

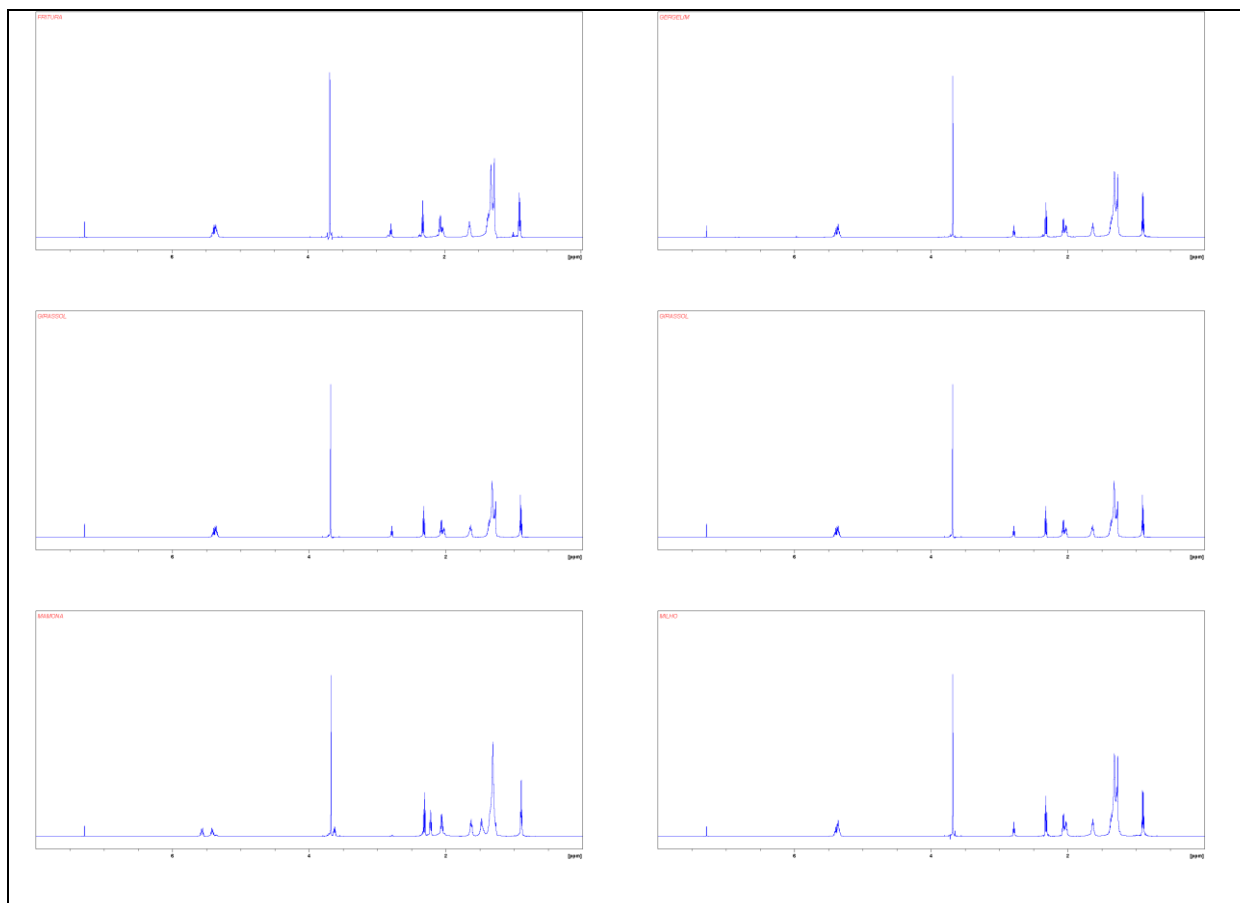
Figura 90: Espectros da análise de RMN ^1H para as amostras de B100 dos materiais graxos: A) algodão – 99,72%_{FAME}, B) amêndoa – 96,65%_{FAME}, C) amendoim – 99,46%_{FAME}, D) canola – 99,40%_{FAME}, E) chia – 97,82%_{FAME}, F) coco – 97,91%_{FAME}, G) dendê – 97,49%_{FAME} e H) gordura de frango – 98,27%_{FAME}.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 101: Espectros da análise de RMN ^1H para as amostras de B100 dos materiais graxos: A) óleo residual de fritura – 98,14%_{FAME}, B) gergelim – 98,34%_{FAME}, C) girassol –

96,81%_{FAME}, D) macaúba – 98,51%_{FAME}, E) mamona – 98,29%_{FAME} e F) milho – 98,17%_{FAME}



Fonte: Autor, 2020.

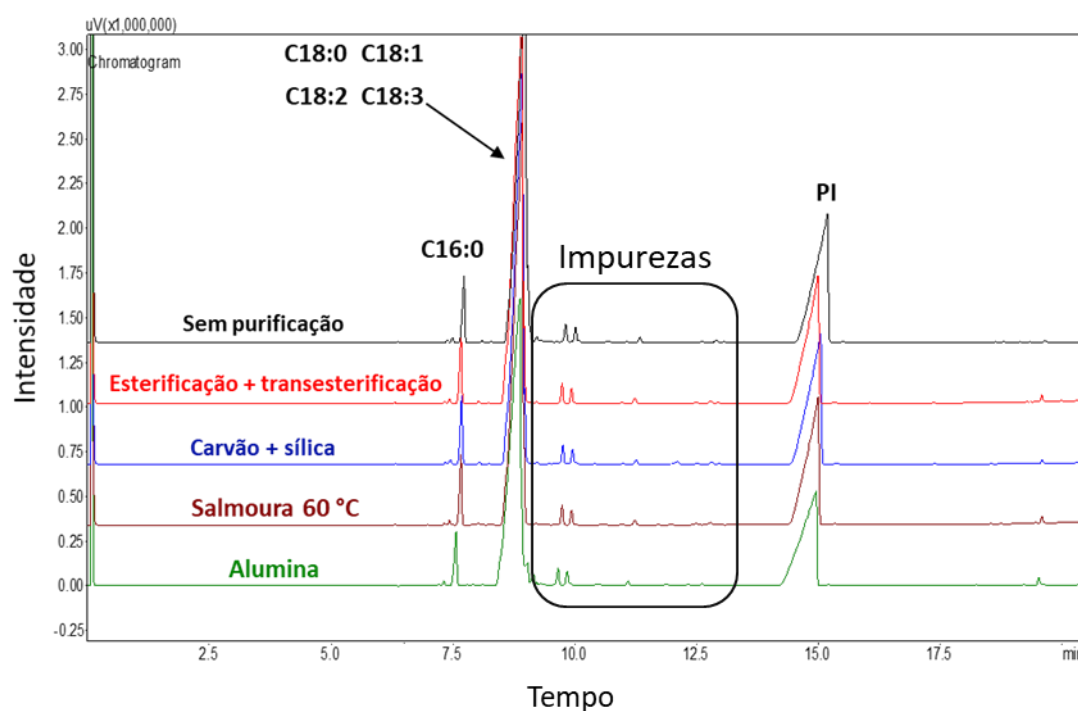
Como descrito na metodologia deste trabalho, item 5.2, a porcentagem de conversão de triglicerídeos em ésteres metílicos foi determinada com base na integração das áreas dos sinais dos prótons do grupo metóxido dos ésteres metílicos (3,7 ppm) e grupo metileno dos derivados de ésteres graxos (2,3 ppm).

No anexo 1, constam os espectros com a identificação dos sinais, dos quais foram integradas as áreas e calculada a conversão de triacilglicerídeos em ésteres metílicos.

5.2 Análises de interferentes em GC/MS

A Figura 12 demonstra a análise cromatográfica em GC–FID para a amostra de biodiesel do óleo de canola antes e depois de submetido aos processos de purificação, com destaque para as possíveis impurezas. Portanto, as amostras foram analisadas em GC/MS para identificação destes compostos (Figura 13).

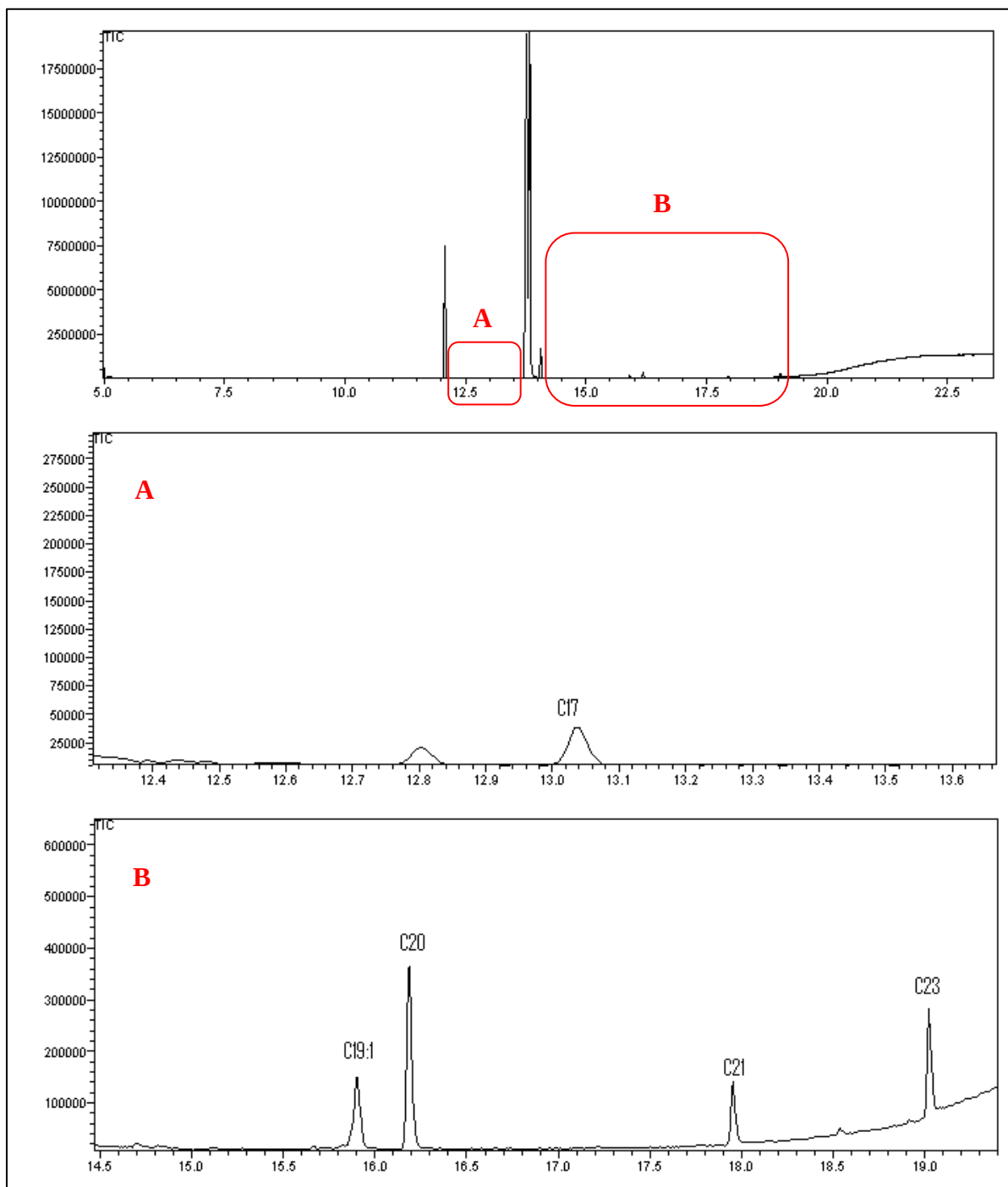
Figura 12: Cromatogramas obtido a partir da análise do B100 de canola antes e depois de cada processo de purificação (GC–FID).



Nota: análises realizadas por meio do método GCSCRF (SILVA et al., 2018).

Como exemplo, a Figura 13 apresenta o cromatograma obtido em GC/MS para o biodiesel metílico de óleo de milho, com amplificações nas regiões onde pode-se observar os picos em quantidades relativamente insignificantes, isto é, a soma das áreas corresponde a menos do que 1% após a purificação.

Figura 13: Cromatograma obtidos por meio da análise em GC/MS para o biodiesel B100 produzido a partir do óleo de milho. As regiões A e B, encontra-se destacadas.



Fonte: Autor, 2020.

Com base na biblioteca de espectros NIST 2008 do GC/MS e no cromatograma da Figura 13, picos em menores quantidades foram identificados como ésteres metílicos (C17, C19:1, C20, C21 e C23) minoritários produzidos na reação de

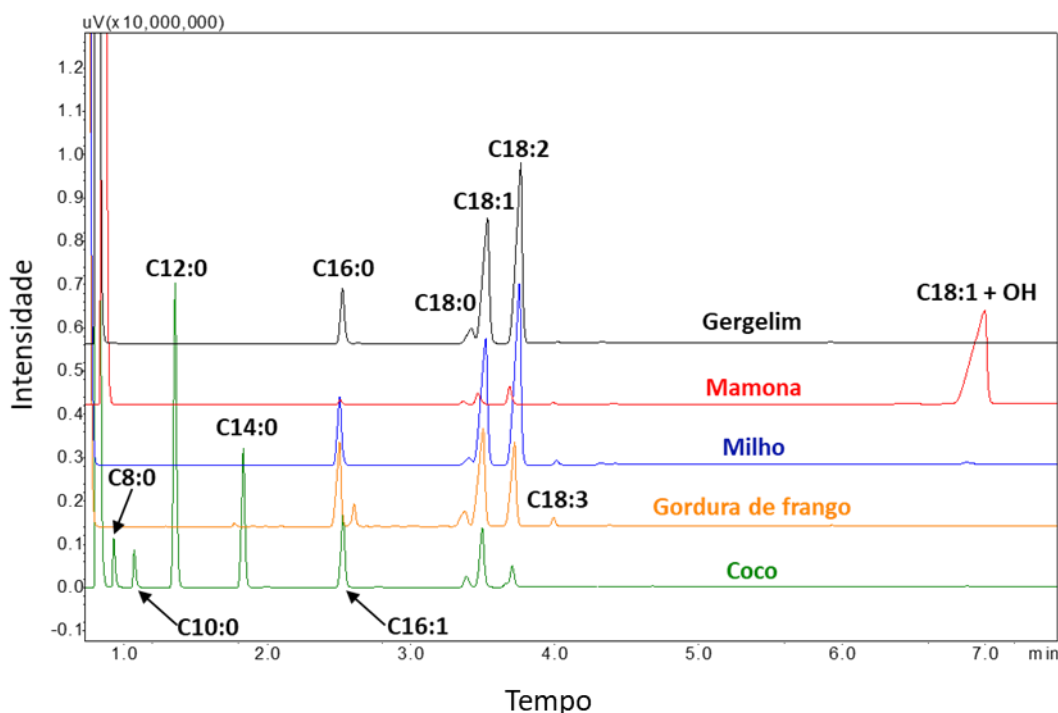
transesterificação de triacilglicerídeos provenientes de materiais graxos ou do processo de refino destes materiais.

5.3 Determinação da composição de ácidos graxos dos óleos e gorduras

Foi determinada a composição em ácidos graxos para cada tipo de material graxo empregado na produção de biodiesel metílico e, em seguida, estes dados foram utilizados na otimização e validação da metodologia de *Fast GCRF*.

Na Figura 14 estão representados alguns cromatogramas obtidos na caracterização de materiais graxos a partir da análise de biodiesel B100, óleo de gergelim, mamona, milho, gordura de frango e óleo de coco, para representar a metodologia utilizada na caracterização das matérias-primas em teor de ácidos graxos.

Figura 11: Cromatogramas obtidos para a análise do biodiesel B100 de óleo de gergelim, mamona, milho, gordura de frango e coco, no método de caracterização de ácido graxos.



Fonte: Autor, 2020.

Nota: Ésteres de ácido graxo: C8:0 – caprílico; C10:0 – cáprico; C12:0 – láurico; C14:0 – mirístico, C16:0 – palmítico, C16:1 – palmitoléico, C18:0 - esteárico; C18:1 - oleico, C18:2 – linoléico; C18:1 + OH – ricinoleico.

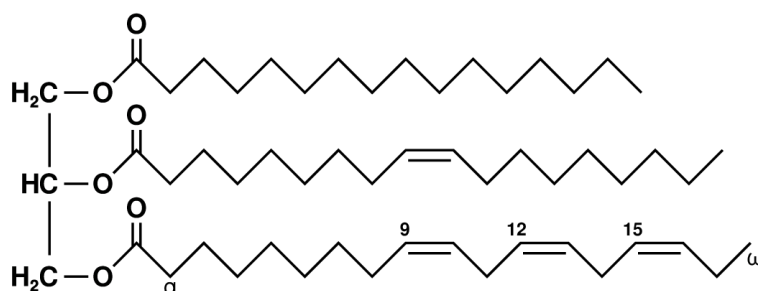
Ao comparar os tempos de retenção dos picos do cromatograma das amostras de B100, Figura 14, com os tempos dos padrões de ésteres metílicos injetados nas mesmas condições instrumentais, foi possível identificar e quantificar os ácidos graxos constituintes destes óleos. Da mesma forma, foi realizada a caracterização dos demais materiais graxos avaliados, cujos perfis em ácidos graxos estão representados na Tabela 7 com valores médios das análises em triplicata.

Os perfis de ácidos graxos apresentados na Tabela 7 foram utilizados para o cálculo da massa molecular dos triacilglicerídeos e massa molar da matéria graxa empregada na produção de biodiesel (equações 09 e 10, respectivamente) e determinar as relações molares dos reagentes nas reações de transesterificação de cada tipo de material graxo.

$$MM_{TAG} = 41 + 3 (MM_{AG} - 1) \quad (09)$$

Onde MM_{TAG} é a massa molar do triacilglicerídeo da matéria-prima; 41 é o valor da massa da porção ($H_2C - C - CH_2$) da molécula de triacilglicerídeos (Figura 15); e o valor 1 representa um átomo de hidrogênio a menos na função carboxila em cada uma das três cadeias de ácido graxo da molécula de triacilglicerídeos.

Figura 12: Estrutura molecular do triacilglicerídeo com três cadeias de ácido graxo.



Fonte: SCHAEFER, 2005.

Nota: Porção à esquerda: glicerol. Porção à direita (de cima para baixo): ácido palmítico, ácido oleico, ácido alfa-linolênico. Fórmula: $C_{55}H_{98}O_6$.

$$MM_{Matéria\ Graxa} = \frac{(\sum MM_{TAG}) \times \%éster}{100} \quad (10)$$

Onde $MM_{Matéria\ Graxa}$ é a massa molar total da matéria-prima; $\sum MM_{TAG}$ é a soma das massas molares dos triacilglicerídeos, cada uma multiplicada pela respectiva porcentagem de ácido graxo presente na matéria-prima.

Tabela 7: Composição em ácidos graxos, determinada por cromatografia gasosa, para os óleos avaliados durante o projeto.

MATERIAL GRAXO	ÁCIDOS GRAXOS ($\pm 1,0$ % massa)											
	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1 +OH	C:20
<i>Algodão</i>	-	-	-	0,7	23,6	0,4	1,8	15,5	58,0	-	-	-
<i>Amêndoa</i>	-	-	-	0,1	37,6	0,4	2,7	32,4	26,4	0,1	-	0,5
<i>Amendoim</i>	-	-	-	-	6,8	-	-	89,7	-	-	-	1,1
<i>Canola</i>	-	-	-	-	4,9	0,2	0,2	66,8	19,9	8,0	-	-
<i>Chia</i>	-	-	-	-	6,9	-	0,75	4,4	20,1	67,8	-	-
<i>Coco</i>	5,2	4,2	40,1	20,9	12,5	-	2,3	11,7	3,0	-	-	-
<i>Dendê</i>	-	-	-	0,2	17,9	-	3,1	30,4	48,3	-	-	-
<i>Gergelim</i>	-	-	-	-	10,5	-	2,8	35,8	50,6	0,3	-	-
<i>Girassol</i>	-	-	-	0,1	5,8	-	1,4	34,9	58,0	-	-	-
<i>Gordura de frango</i>	-	-	-	0,6	22,3	4,5	4,9	35,4	26,0	1,8	-	-
<i>Macaúba</i>	-	-	0,3	0,2	19,4	3,5	-	57,9	17,3	1,3	-	-
<i>Mamona</i>	-	-	-	-	1,1	-	0,9	3,8	4,9	0,4	88,1	0,6

<i>Milho</i>	-	-	-	-	12,7	-	1,2	35,5	49,2	0,7	-	0,7
<i>Óleo de fritura</i>	-	-	-	0,3	14,0	0,4	1,2	24,5	53,6	6,0	-	-
<i>Soja</i>	-	-	-	-	11,6	-	3,0	24,6	54,2	6,7	-	-

Fonte: Autor, 2020.

Nota: Ácidos graxos: C8 – caprílico; C10 – cáprico; C12 – láurico; C14 – mirístico; C16 – palmítico; C17 – margárico; C18 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linolêico; C18:3 – linolênico; C18:1 + OH – ricinoleico; C20 – araquídico; Análise em triplicata, n = 3.

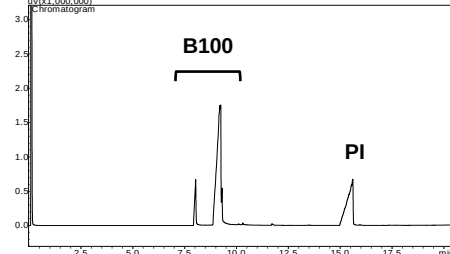
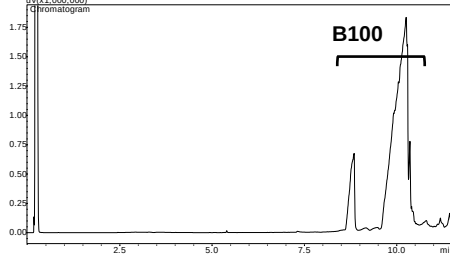
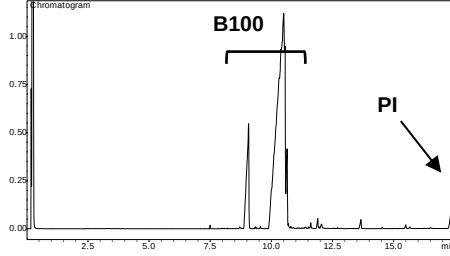
5.4 Otimização do método de *Fast* GCRF

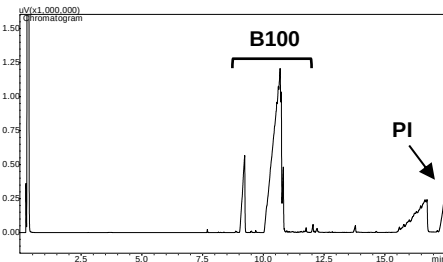
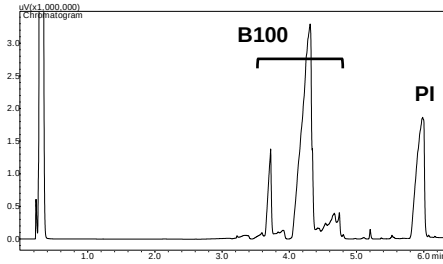
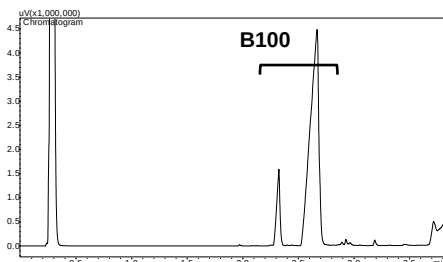
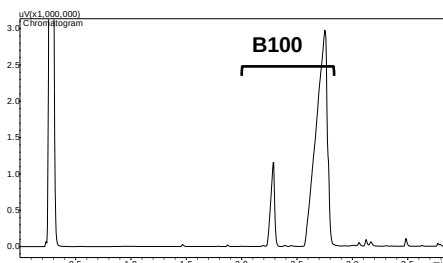
Como citado na sessão de materiais e métodos, o método GCSCRF (SILVA et al., 2018; ANEXO 2), validado anteriormente no GCaR para análise do biodiesel do óleo de soja, foi definido como base experimental para iniciar a otimização da metodologia analítica de *Fast* GCRF.

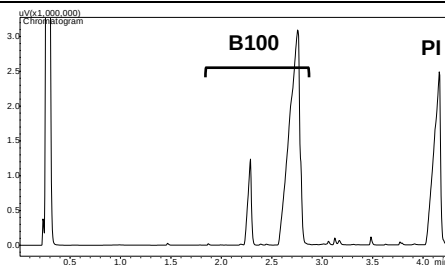
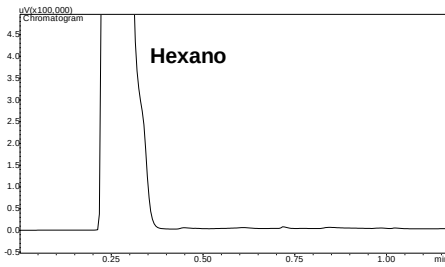
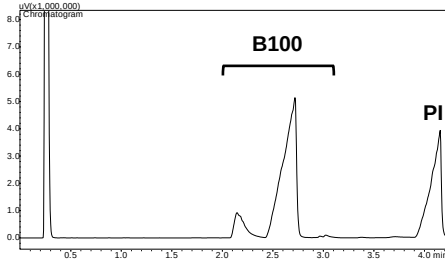
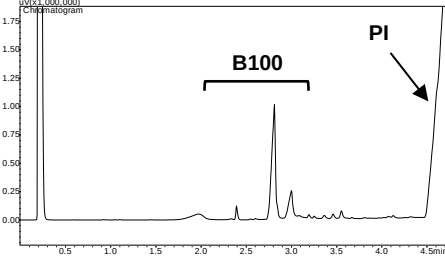
A principal modificação instrumental introduzida foi o emprego de coluna cromatográfica específica para a metodologia de *Fast* GCRF, de medidas (10 m × 0,1 mm × 0,1 µm) e o uso da coluna para o método GCSCRF com medidas (2,2 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A coluna foi escolhida com base na diminuição do diâmetro interno e da espessura de filme, características que elevam a eficiência da mesma na separação dos analitos.

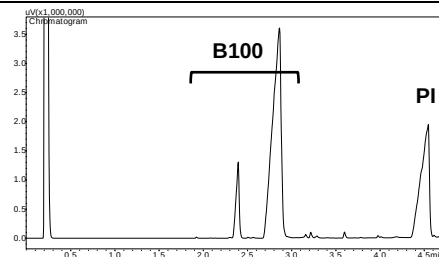
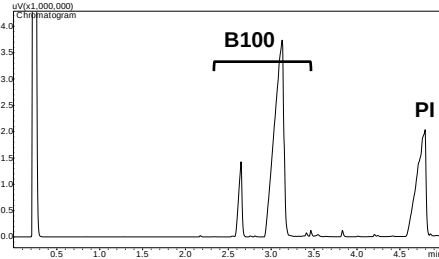
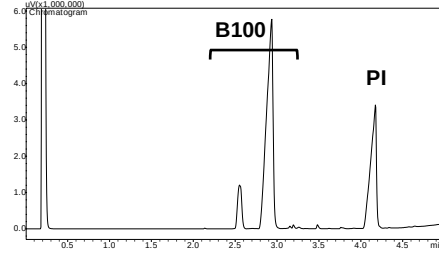
Os parâmetros instrumentais utilizados foram baseados nos artigos citados na Tabela 2 (RAGONESE et al., 2009; SATO et al., 2015; MARQUES et al., 2010; HUPP et al., 2018; TERCINI et al., 2018) e estão representados na Tabela 8 com os respectivos cromatogramas e tempos de análises do B100 produzido a partir do óleo de soja (C16 – C18). O método GCSCRF foi colocado no topo da Tabela 8 para efeitos de comparação com as modificações realizadas na construção do método de *Fast* GCRF.

Tabela 8: Parâmetros instrumentais estudados durante a otimização do método de *Fast GCRF*.

Condição	Fluxo H ₂ (mL min ⁻¹)	Rampa de aquecimento	Parâmetro constante	Tempo (min)	Tempo real (min)	Observações	Cromatograma
GCSCRF	1,6	50 - 180 °C (15 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (7 °C min ⁻¹) 230 - 340 °C (30 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	20,48	20,48	- coluna 2,2 m.	
1	1,6	50 °C (1min) 50 - 180 °C (15 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (7 °C min ⁻¹) 230 - 340 °C (30 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	20,48	11,5	- coluna 10 m e 0,1 mm; - aumento t _R ; - pressão máxima do equipamento; - IS não eluiu; - análise interrompida.	
2	1,6	50 °C (1min) 50 - 180 °C (15 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (7 °C min ⁻¹) 230 - 340 °C (30 °C min ⁻¹)	Pressão interna da coluna	20,48	17,50	- diminuição t _R ; - fluxo máximo do equipamento; - IS eluiu parcialmente; - análise interrompida.	

3	1,0	Sem isoterma inicial 50 - 180 °C (15 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (7 °C min ⁻¹) 230 - 340 °C (30 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	20,48	17,50	- aumento t_R; - pressão máxima do equipamento; - IS eluiu parcialmente; - análise interrompida.	
4	1,0	50 °C (1min) 50 - 180 °C (60 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (28 °C min ⁻¹) 230 - 340 °C (80 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	6,33	6,33	- rampas de temperaturas até 4x maiores; - diminuição t_R.	
5	1,0	50 - 270 °C (70 °C min ⁻¹) 270 - 340 °C (100 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	3,84	3,84	- rampas de temperaturas maiores; - IS não eluiu.	
6	1,0	Sem isoterma inicial 50 - 180 °C (75 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (35 °C min ⁻¹) 230 - 300 °C (100 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	3,86	3,86	- rampas de temperaturas 5x maiores; - temperatura final não atingida; - IS não eluiu.	

7	1,0	50 - 180 °C (75 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (35 °C min ⁻¹) 230 - 340 °C (100 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	4,26	4,26	- aumento da temperatura final; - IS eluiu próximo ao término da análise.	
8	1,0	60 - 180 °C (80 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (35 °C min ⁻¹) 230 - 360 °C (100 °C min ⁻¹)	Fluxo de H ₂	4,23	1,16	- 1ª rampa de maior; - aumento da temperatura final; - pressão máxima do equipamento; - analitos não eluíram; - análise interrompida.	
9	1,0	60 - 180 °C (80 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (35 °C min ⁻¹) 230 - 360 °C (100 °C min ⁻¹)	Pressão interna da coluna	4,23	4,23	- IS eluiu próximo ao término da análise.	
10	1,0	60 - 180 °C (80 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (35 °C min ⁻¹) 230 - 360 °C (100 °C min ⁻¹) 360 °C (0,5min)	Pressão interna da coluna	4,73	4,73	- isoterma na temperatura final; - IS eluiu parcialmente.	

11	1,2	60 - 180 °C (80 °C min ⁻¹) 180 - 230 °C (35 °C min ⁻¹) 230 - 360 °C (100 °C min ⁻¹) 360 °C (0,5min)	Pressão interna da coluna	4,73	4,73	- Equipamento não manteve taxa de aquecimento > 60 °C min ⁻¹	
12	1,2	60 – 360 °C (60 °C min ⁻¹)	Pressão interna da coluna	5,00	5,00	- IS eluiu próximo ao término da análise.	
13	1,3	60 – 360 °C (60 °C min ⁻¹)	Pressão interna da coluna	5,00	5,00	- Eluição total.	

Fonte: Autor, 2020.

De acordo com os cromatogramas apresentados na Tabela 8, condições 1, 2 e 3, pode-se observar que houve aumento nos tempos de retenção dos analitos devido ao menor comprimento (2,2 m) da coluna empregada no método GCSCRF, quando comparada a coluna com 10 m de comprimento, utilizada no método de *Fast GCRF* desenvolvido.

Em ambas as condições 1 e 2, o PI não eluiu durante a análise e, portanto, as condições não foram satisfatórias. Na condição 1, também foi observado que a pressão aumentou no decorrer da análise chegando a forçar o equipamento a interromper a análise. Também foi observado que na condição 2, quando mantida a pressão interna da coluna constante, o fluxo é aumentado ao longo da análise e, conseqüentemente, os analitos eluem mais rapidamente.

A condição de análise 3, apresenta um tempo total de análise reduzido (menor que o programado, 20,48 min) devido a pressão interna da coluna ter atingido um valor muito elevado, comprometendo o tempo total de análise e a realização da rampa de temperatura.

Para otimizar essa metodologia de *Fast GCRF*, na condição 4, aplicaram-se rampas com velocidade de aquecimento até 4x mais rápidas que o método de GCSCRF e, foi observado que o tempo total de análise diminuiu consideravelmente (6,33 min) sem perder a eficiência na separação dos analitos totais e padrão interno.

Na condição 5 tentou-se diminuir ainda mais o tempo de análise, para 3,84 min, aumentando a taxa de aquecimento, porém, foi verificado que o PI (tricaprilina) não eluiu antes do término da análise.

Nas condições de 6 a 8, a terceira rampa de aquecimento ($150^{\circ}\text{C min}^{-1}$) foi diminuída para $100^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sendo possível manter o fluxo da fase móvel constante. A diferença entre estes três métodos é a temperatura final da coluna e, como pode ser visto nas nos cromatogramas representados na Tabela 8, conforme a temperatura aumentou, a eluição do PI foi favorecida.

Como pode ser visto na condição 8, quando a temperatura final foi igual a 360 °C e fluxo de fase móvel constante, o aparelho atinge uma pressão muito alta e a análise é interrompida.

Na sequência foi realizada a análise na condição 9 com a mesma programação de temperatura da condição 8, porém, mantendo a pressão interna da coluna constante e foi verificado que o PI não eluiu completamente em 4,23 min de análise.

Na condição instrumental 10, foram utilizadas as mesmas condições instrumentais da condição 9 acrescida da isoterma de 0,5 min na temperatura final, porém, o padrão interno não eluiu antes do término da análise.

Em seguida, com o intuito de otimizar a eluição do PI, foi adotada a condição 11 para análise, na qual, foi aumentado o fluxo do gás de arraste para 1,2 mL min⁻¹, tornando possível a eluição do padrão interno.

Durante a aplicação das mudanças instrumentais adotadas no desenvolvimento do método proposto, foi observado que, o equipamento de GC utilizado apresentou uma série de limitações. O mesmo não tem a capacidade de efetuar a programação de temperatura com elevadas taxas de aquecimento, de forma que, a temperatura máxima não é atingida ao término da análise.

Constatou-se também que, empregando o mesmo equipamento com rampas de aquecimento muito rápidas (taxa > 60 °C min⁻¹), a velocidade do gás de arraste não permanece constante.

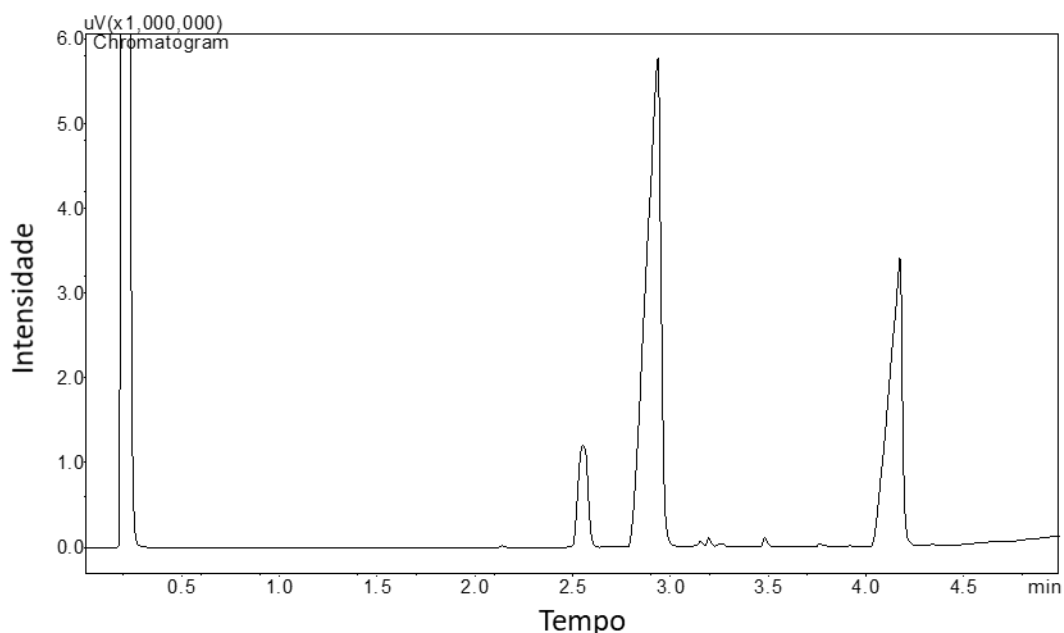
No equipamento GC/FID empregado, é possível configurar a pressão interna da coluna constante ou, o fluxo de gás de arraste constante. Quando selecionado o modo de fluxo constante, foi observado que a pressão interna da coluna aumentou significativamente e a análise foi interrompida antes do término da programação de temperatura.

Com base nas informações supracitadas, foi estabelecida a condição 12 com pressão interna da coluna constante e rampa de aquecimento única, onde foio

verificado que, em 5 min de análise, ocorreu a eluição de todos os compostos de interesse, presentes na amostra B100 de soja.

Com a finalidade de diminuir o tempo de retenção dos analitos, na condição 13 (Figura 16), foi elevado o fluxo do gás de arraste para $1,3 \text{ mL m}^{-1}$ e dessa forma, todos os analitos eluíram e foi possível diminuir o tempo de retenção dos mesmos.

Figura 13: Cromatograma obtido com a condição 13 para análise de Fast GCRF descrito na Tabela 8.



Fonte: Autor, 2020.

Conforme visto no cromatograma da Figura 16, os parâmetros instrumentais empregados na condição 13 foram adequados para analisar o biodiesel do óleo de soja. Logo, esta metodologia foi empregada na análise do biodiesel produzido a partir de diferentes materiais graxos.

5.5 Validação da metodologia *Fast GCRF* para a análise de FAMES em biodiesel

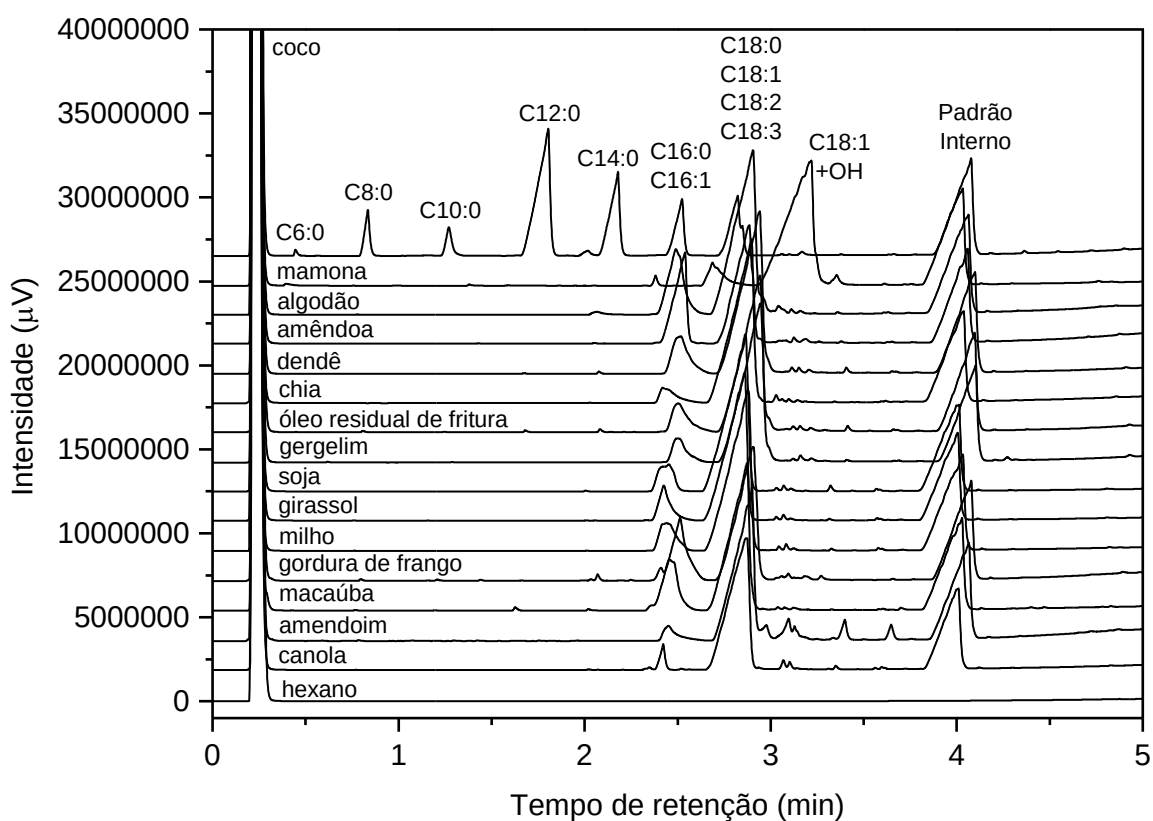
Os parâmetros de desempenho analítico foram avaliados empregando os parâmetros instrumentais considerados adequados, condição 13 (Tabela 8), estabelecida como a metodologia otimizada, ou seja, metodologia proposta no

trabalho. O método foi aplicado e validado quanto a determinação de FAME totais em amostras de biodiesel produzido a partir do óleo de algodão, amendoim, amêndoa, canola, chia, coco, dendê, gergelim, girassol, gordura de frango, macaúba, mamona, milho, óleo residual de fritura e soja.

5.5.1 Seletividade

Na Figura 17 estão representados os cromatogramas obtidos a partir das análises dos 15 tipos de B100, no qual pode-se avaliar a seletividade do método em separar e identificar os analitos (ésteres metílicos totais) e padrão interno.

Figura 14: Estudo da seletividade do método Fast GCRF através da comparação de cromatogramas do solvente hexano e amostras B100 de diferentes materiais graxos: óleo de coco, óleo de mamona, óleo de algodão, óleo de amêndoa, óleo de dendê, óleo de chia, óleo resid



Fonte: Autor, 2020.

Nota: ésteres de ácido graxo: C6:0 – capróico; C8:0 – caprílico; C10:0 – cáprico; C12:0 – láurico; C14:0 – mirístico, C16:0 – palmítico, C16:1 – palmitoléico, C18:0 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linoléico; C18:3 – linolênico; C18:1(OH) – ricinoleico.

Com base nos cromatogramas da Figura 17, foi observado que o método de *Fast GCRF*, proposto neste trabalho, não separou alguns ésteres metílicos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3) de interesse em relação ao número de insaturações destes compostos porém, a metodologia foi otimizada com a finalidade de quantificar FAMES totais, logo separados do padrão interno.

A Tabela 9 apresenta os valores calculados para o fator de separação entre o último pico relativo a FAMES (mistura de C18; no caso da mamona foi considerado o pico referente ao analito C18:1 + OH), com maior tempo de retenção, t_1 , e o pico do padrão interno tricaprilina (PI), definido como t_2 .

Tabela 9: fator de separação entre o último pico de FAMES e o pico de Padrão interno.

Biodiesel	t₁ (min)	t₂ (min)	Fator de separação γ
Algodão	2,90	4,06	1,40
Amêndoa	2,88	4,06	1,41
Amendoim	2,90	4,06	1,40
Canola	2,87	4,01	1,40
Chia	2,90	4,03	1,39
Coco	2,82	4,08	1,44
Dendê	2,94	4,10	1,39
Fritura	2,94	4,09	1,39
Gergelim	2,95	4,10	1,39
Girassol	2,86	4,01	1,40
Gordura de frango	2,91	4,08	1,40
Macaúba	2,87	4,03	1,40
Mamona	3,22	4,03	1,25
Milho	2,88	4,03	1,40
Soja	2,90	4,06	1,40

Fonte: Autor, 2020.

Como a seletividade de um método cromatográfico é diretamente proporcional ao fator de separação e, os resultados apresentados na Tabela 9 indicam valores experimentais > 1 para o fator de separação determinado para todos os tipos de biodiesel, o método respondeu com efetiva seletividade para separar os ésteres totais em relação ao padrão interno.

5.5.2 Precisão

Como descrito no item 4.9.2, a precisão da metodologia *Fast* GCRF foi avaliada através dos estudos de precisão instrumental, estudo da repetitividade e precisão intermediária, todas expressas pelo desvio padrão relativo (RSD).

Conforme indicado pelo INMETRO (2018), durante o estudo da precisão do método proposto, foi considerado o número mínimo de 6 replicatas para o cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

5.5.2.1 Precisão instrumental

A Tabela 10 apresenta os valores de Teor_{FAME} %, média, desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD) para cada tipo de biodiesel.

Tabela 10: Precisão instrumental para o método *Fast GCRF*; SD- desvio padrão. RSD- desvio padrão relativo.

Análise	Tipo de biodiesel e Teor _{FAME} %														
	Soja	Milho	Girassol	Macaúba	Frango	Coco	Amendoim	Algodão	Gergelim	Canola	Amêndoa	Chia	Fritura	Dendê	Mamona
1	83,0	70,0	73,1	60,7	66,7	65,1	80,2	65,8	63,9	60,9	73,1	82,3	81,7	63,7	70,1
2	80,8	71,5	72,6	60,4	65,3	65,4	78,4	65,3	64,9	62,9	72,6	87,2	83,8	64,6	68,9
3	83,0	68,8	74,4	60,7	68,2	65,0	82,2	65,7	65,1	65,1	74,4	82,9	80,7	65,2	68,4
4	81,1	69,3	71,6	58,7	67,3	65,9	80,4	65,1	65,0	64,3	71,6	82,8	82,0	64,7	67,9
5	82,6	68,5	73,8	60,0	66,0	67,1	80,0	64,8	64,2	63,5	73,8	83,1	81,1	65,6	68,6
6	82,6	69,0	73,1	59,8	67,0	69,8	79,7	64,9	65,2	62,5	73,1	84,3	82,6	64,3	67,3
7	80,5	70,8	74,0	60,5	67,7	67,7	80,4	66,9	65,1	60,9	74,0	83,2	83,8	64,0	69,1
8	80,9	69,4	72,2	58,8	65,9	68,1	78,9	64,3	64,6	64,6	72,2	83,4	83,5	60,6	67,0
9	82,7	70,3	73,9	61,0	68,2	67,4	78,6	65,4	66,1	62,9	73,9	82,8	81,7	64,5	70,6
10	83,5	70,8	71,0	61,0	66,6	67,6	78,8	65,7	64,6	63,8	71,0	84,9	85,9	66,1	67,7
Média	82,1	69,8	73,0	60,2	66,9	66,9	79,8	65,4	64,9	63,1	66,9	83,3	82,7	64,7	68,7
SD	1,1	1,0	1,1	0,8	1,0	1,5	1,1	0,7	0,6	1,4	1,3	0,8	1,6	0,8	1,2
RSD	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	2,3	1,4	1,1	0,9	2,3	1,9	1,0	1,9	1,2	1,7

Fonte: Autor, 2020. Nota: Foi aplicado o teste de *Grubbs* (teste G) a 95% de confiança; e os valores destacados foram excluídos.

Quando aplicado o teste de *Grubbs*, para os valores das medidas apresentados na Tabela 10, apenas as amostras de biodiesel produzido a partir do óleo de chia e do óleo de dendê, apresentaram valores rejeitados (destacados em vermelho), portanto apenas para estes dois óleos os valores de RSD foram calculados com 9 medidas.

Os valores de RSD, determinados durante o estudo da precisão instrumental, variaram entre 0,9 – 2,3% e estão dentro da faixa que confirma a homogeneidade dos resultados para todos os tipos de amostras, 0% - 10% (TIMBÓ, 2014).

Além disso, todos os valores determinados para RSD estão entre os limites aceitáveis para metodologias que quantificam compostos em macro quantidades que admitem RSD de 1 a 2% e, métodos de análise de traços ou impurezas onde é aceitável um RSD de 20% (RIBANI et al., 2004). Desta forma, o método apresentou precisão instrumental aceitável e homogeneidade entre os resultados para a análise de todos os tipos de biodiesel.

5.5.2.2 Intra- ensaio (Repetitividade)

A Tabela 11 representa o estudo da repetitividade (precisão intra- ensaio) onde as amostras foram preparadas 10 vezes para análise.

Tabela 11: Estudo da repetitividade do método *Fast GCRF*; SD - desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo.

Preparo e Análise	Tipo de biodiesel e Teor _{FAME} %		
	Milho	Frango	Chia
1	79,3	59,0	8,0
2	78,9	57,9	8,3
3	78,7	57,4	8,1
4	80,1	56,8	8,1
5	77,9	59,8	8,4
6	79,0	60,1	8,3
7	79,3	58,5	9,8
8	79,3	54,0	8,8
9	79,4	58,0	8,8
10	78,5	55,0	8,6
Média	79,0	57,7	8,4
SD	0,6	1,1	0,3
RSD	0,8	3,4	3,6

Fonte: Autor, 2020.

Nota: Os valores em vermelhos não foram considerados para os cálculos da média, SD e RSD, com base no teste de rejeição de *Grubbs* a 95% de confiança.

Como apresentado na Tabela 11, foi aplicado o teste de rejeição de *Grubbs* de forma que, apenas a amostra de biodiesel do óleo de chia, apresentou um valor rejeitado, sendo calculado com 9 medidas.

Em relação aos valores de RSD, determinados no estudo da precisão intra-ensaio, todos estão dentro da faixa, 0% a 10% (TIMBÓ, 2014), que permite classificar o método como preciso, com resultados homogêneos, isto é, sem dispersões significativas.

5.5.2.3 Precisão intermediária

As condições variadas para o estudar da precisão intermediária foram: dia de análise e analista. No caso da mudança do analista, a precisão intermediária ainda foi relacionada ao dia de análise, visto que, cada analista realizou análise em dia diferente. A variância (SD^2) foi comparada utilizando o teste de significância estatística *F de Fisher*, de acordo com a equação 10:

$$F = \frac{SD_1^2}{SD_2^2} \quad (10)$$

Onde SD_1^2 é a variância de maior valor; SD_2^2 é a variância de menor valor. O valor experimental de F é comparado com o valor tabelado da distribuição de *Fisher* bicaudal com $(n - 1)$ graus de liberdade no numerador e $(n - 1)$ graus de liberdade no denominador, n = número de medidas, para 95% de confiança.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos com o estudo da precisão intermediária considerando a mudança do analista e dia de análise.

Tabela 12: Estudo da precisão intermediária do método *Fast GCRF* com mudança de analista (A e B) e dia de análise; SD - desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo; F - Teste de Fisher.

Análise	Tipo de biodiesel e Teor _{FAME} %									
	Macaúba		Gergelim		Amêndoa		Gordura de frango		Milho	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	60,7	62,9	68,3	70	66,1	64,4	57,2	57,6	77,0	75,3
2	60,4	61,5	66,4	67,1	66,2	64,7	55,1	57,8	76,8	76,1
3	60,7	61,8	68,2	67,8	65,7	66,3	59,6	57,8	77,3	78,3
4	58,7	60,1	65,9	68,4	67,9	66,4	58,0	59,8	77,7	77,2
5	60	62,3	68,7	68,2	67,4	66,5	56,8	59,0	76,0	76,9
6	59,8	63,2	68,8	68,5	65	65,8	58,3	59,1	77,5	76,3
7	60,5	62,4	69	65,4	66,6	66,6	55,2	58,8	79,1	76,9
8	58,8	61,9	66,9	68,5	65,1	66,9	54,7	58,9	76,9	78,8
9	61	62	65,5	69,8	67,5	66,7	55,1	59,9	75,4	77,9
10	61	62,3	66,2	67,8	67,2	65,3	57,5	60,7	76,8	77,2
Média	60,2	62,0	66,6	68,2	65,5	66,0	56,7	58,9	77,0	77,1
SD	0,8	0,8	1,3	1,3	1,0	0,9	1,6	1,0	1,0	1,1
SD ²	0,7	0,7	1,8	1,7	1,0	0,8	2,7	1,0	1,0	1,1
RSD	1,4	1,4	2,0	1,9	1,5	1,3	2,9	1,7	1,3	1,4
F _{experimental}	1,0		0,9		1,4		2,71		1,12	
F _{tabelado}	4,03									

Fonte: Autor, 2020.

Nota: Todas as medidas foram aceitas, ao aplicar o teste de *Grubbs* a 95% de confiança, e consideradas para os cálculos de média, SD e RSD.

Quando realizada a comparação das medidas com base no Teste *F*, foi verificado que não existe uma dispersão significativa entre os valores de SD dos

analistas A e B, $F_{\text{experimental}} < F_{\text{tabelado}}$, para todos os tipos de biodiesel avaliados no estudo da precisão intermediária, como demonstrado na Tabela 12.

A variação dos valores de RSD pode estar relacionada a instabilidade das amostras de biodiesel, as quais podem ter os valores de teor de FAMES alterados, acrescidos ou diminuídos, durante longos períodos de estocagem. Outro fator, que pode ter contribuído para a diferença de valores para RSD, é a variação na quantidade de amostra e modo de injeção para cada analista durante o estudo.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos com o estudo da precisão intermediária realizado pelo mesmo analista, porém em dias diferentes. No dia 2, o preparo de amostra foi realizado variando a massa de amostra pesada para cada uma das 10 replicatas medidas para verificar se há influência do valor da massa nos valores das medidas.

Tabela 13: Precisão intermediária do método *Fast* GCRF com variação no dia de análises; SD - desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo; F - Teste

Preparo e Análise	Tipo de biodiesel e Teor FAMES %			
	Milho		Frango	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	70,0	79,3	66,7	59,0
2	71,5	78,9	65,3	57,9
3	68,8	78,7	68,2	57,4
4	69,3	80,1	67,3	56,8
5	68,5	77,9	66,0	59,8
6	69,0	79,0	67,0	60,1
7	70,8	79,3	67,7	58,5
8	69,4	79,3	65,9	54,0
9	70,3	79,4	68,2	58,0
10	70,8	78,5	66,6	55,0
Média	69,8	79,0	66,9	58,4
SD	1,0	0,6	1,0	2,0
SD ²	1,0	0,4	1,0	3,8
RSD	1,4	0,8	1,5	3,4
F _{experimental}	2,80		3,8	
F _{tabelado}	4,03			

Fonte: Autor, 2020.

Nota: Todas as medidas foram aceitas, ao aplicar o teste de *Grubbs* a 95% de confiança, e consideradas para os cálculos de média, SD e RSD.

A precisão intermediária apresentou valores de RSD dentro da faixa 0 – 10%, indicando homogeneidade dos resultados para determinação de FAME pelo método de *Fast* GCRF, quando variado o dia de análise, ou analista. Os valores obtidos para o teste de *Fisher* estão abaixo do valor tabelado com nível de confiança de 95%

demonstrando a significativa semelhança estatística entre os resultados para os dois grupos de medidas.

5.5.3 Robustez

Na Tabela 14 encontra-se o comportamento da resposta do método ao determinar FAMES quando submetidos a modificações no preparo de amostra para três tipos de biodiesel e o respectivo erro instrumental (desvio padrão calculado no estudo da precisão instrumental).

Tabela 14: Modificações realizadas durante o teste da robustez do método e resposta obtida com uma amostra de biodiesel metílico de algodão, amendoim e amêndoa.

Biodiesel	Solvente	Conversão % Duplicata		Média	Erro Instrumental (±%)
Algodão	Hexano	88,6	88,1	88,4	0,7
	2-propanol/ Tolueno	87,7	90,5	88,4	
	Hexano/ NaCl	88,0	89,5	88,8	
Amendoim	Hexano	5,7	5,7	5,7	1,1
	2-propanol/ Tolueno	6,3	5,9	6,1	
	Hexano/ NaCl	6,1	6,1	6,1	
Gordura de frango	Hexano	55,0	55,0	55,0	1,0
	2-propanol/ Tolueno	55,5	55,2	55,4	
	Hexano/ NaCl	53,0	53,0	53,0	
Mamona	Hexano	58,8	58,7	58,7	1,2
	2-propanol/ Tolueno	58,4	60,0	59,2	
	Hexano/ NaCl	61,8	58,1	59,9	
Milho	Hexano	56,3	57,1	56,7	1,0
	2-propanol/ Tolueno	56,5	57,5	57,0	
	Hexano/ NaCl	56,8	57,4	57,1	

Fonte: Autor, 2020.

A utilização da mistura (2-propanol/ tolueno) foi escolhida para dissolver a amostra com base que, essa mistura é prevista na metodologia da norma ASTM D66411, utilizada em estudos anteriores para dissolver amostras de biodiesel e determinar o índice de acidez do biodiesel de soja e de sebo bovino.

A mudança no solvente é fator crucial para a aplicação da metodologia proposta para análise de biodiesel oriundo de diferentes tipos de materiais graxos que apresentam diferentes propriedades físico-químicas, tais como, composição, densidade, viscosidade e acidez, as quais podem influenciar na dissolução das amostras.

Considerando o erro determinado no estudo da precisão instrumental e aplicação do teste de *Grubbs*, foi observado que o método é robusto o suficiente para responder de forma significativa quando variado o preparo de amostra, inclusive a força iônica do meio, sem perder a seletividade e a precisão.

5.5.4 Exatidão: Método de referência e metodologia comparativa

Como descrito em materiais e métodos, a metodologia proposta com *Fast GCRF* foi comparada com duas metodologias de comparação, o método oficial de GC da norma EN 14103:2011, indicado pela ANP, e o método de GC com coluna curta e fator de resposta, GCSCRF, desenvolvido e validado no laboratório GCaR (Silva et al., 2028)

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados da quantificação de FAMES para a análise de 15 tipos de biodiesel nas três metodologias durante a etapa de validação, nas faixas de concentração: < 20%éster, 20% - 40%éster, 40% - 60%éster, 60 - 80%éster, 80 - 100%éster.

Quando adotado o teste G, na avaliação da precisão instrumental, o maior valor obtido para o desvio padrão foi igual a 1,6%, adotado como erro instrumental para o método de *Fast GCRF*, proposto neste trabalho.

As Figuras 18 e 19 demonstram, graficamente, os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16, ou seja, o grau de concordância entre os resultados do método *Fast GCRF versus* método GCSCRF, e *Fast GCRF versus* e EN 14103:2011.

Tabela 15: %FAME obtidos nas análises de biodiesel nos métodos EN 14103, GCSCRF e *Fast GCRF* nas faixas: < 20%, 20 – 40% e 40 – 60%.

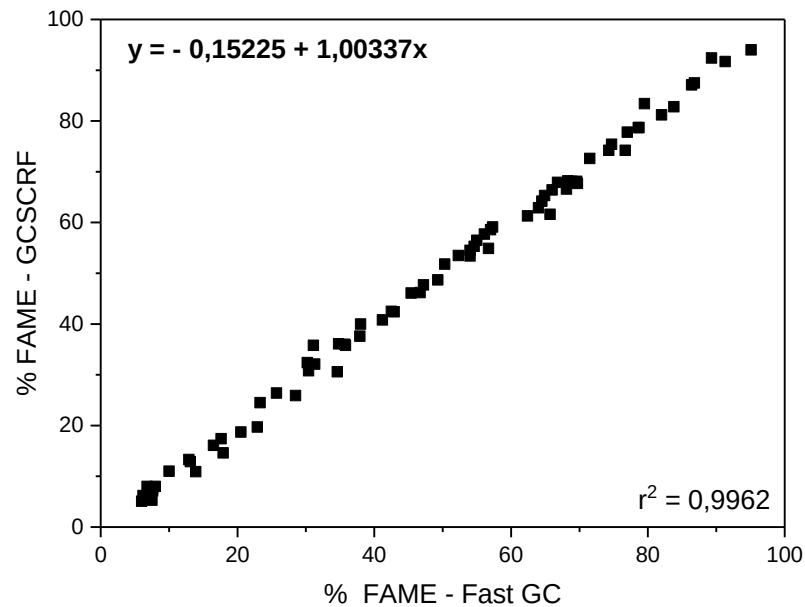
Matéria-prima	Ésteres metílicos (< 20%)			Ésteres metílicos (20 - 40%)			Ésteres metílicos (40 - 60%)		
	EN 14103 (±1,0)	GCSCRF (±0,6)	<i>Fast GCRF</i> (±1,6)	EN 14103 (±1,0)	GCSCRF (±0,6)	<i>Fast GCRF</i> (±1,6)	EN 14103 (±1,0)	GCSCRF (±0,6)	<i>Fast GCRF</i> (±1,6)
Algodão	12,0	10,9	12,0	24,3	25,9	28,5	41,0	42,4	42,9
Amêndoa	7,3	7,5	7,3	31,3	30,8	30,4	53,9	53,5	52,3
Amendoim	7,5	8,0	7,5	38,1	37,6	37,9	46,9	46,1	45,4
Canola	14,6	14,6	14,6	29,9	30,6	34,6	41,4	42,5	42,5
Chia	8,3	8,0	8,3	20	18,7	20,5	46,9	47,7	47,2
Coco	4,9	5,3	4,9	33,7	32,4	30,2	49,7	48,7	49,3
Dendê	14,5	12,9	14,5	34,2	35,8	31,1	51,0	51,8	50,3
Fritura	13,1	13,3	13,1	23,5	24,5	23,3	41,3	40,8	41,2
Gergelim	7,6	6,2	7,6	21,1	19,7	22,9	45,5	46,2	46,7
Girassol	9,0	11,0	9,0	40	40	38	53,0	54,5	54,0
Gordura de frango	7,1	7,1	7,1	35,4	36	35,7	56,5	56,5	55,0
Macaúba	17,2	16,1	17,2	37,3	35,8	35,8	53,2	53,4	54,0
Mamona	17,9	17,4	17,9	31,9	32,1	31,3	55,0	55,3	54,6
Milho	5,9	5,1	5,9	36	36,1	34,8	54,3	54,9	56,7
Soja	6,0	6,2	6,0	26	26,4	25,7	57,0	58,6	57,0

Tabela 16: %FAME obtidos nas análises de biodiesel nos métodos EN 14103, GCSCRF e *Fast GC* nas faixas: 60 – 80% e 80 – 100%.

Matéria-prima	Ésteres metílicos (60 - 80%)			Ésteres metílicos (80 - 100%)		
	EN 14103 ($\pm 1,0$)	GCSCRF ($\pm 0,6$)	<i>Fast GC</i> RF ($\pm 1,6$)	EN 14103 ($\pm 1,0$)	GCSCRF ($\pm 0,6$)	<i>Fast GC</i> RF ($\pm 1,6$)
Algodão	62,0	62,9	64,0	82,1	82,8	83,8
Amêndoa	66,7	68,2	68,3	93,5	92,4	89,3
Amendoim	69,0	65,3	64,9	92,9	91,7	91,3
Canola	63,4	64,2	64,5	74,0	74,2	76,7
Chia	76,1	77,8	77,0	79,3	83,4	79,5
Coco	68,3	67,7	69,7	64,5	66,4	66,0
Dendê	58,9	59,1	57,3	76,0	75,4	74,7
Fritura	87,1	87,5	86,8	81,8	81,2	82,0
Gergelim	63,3	61,6	65,7	75,0	74,2	74,3
Girassol	68,0	67,9	66,8	85,9	87,1	86,4
Gordura de frango	67,1	66,6	68,1	66,0	68,1	69,6
Macaúba	58,7	61,3	62,4	79,1	78,7	78,6
Mamona	57,4	57,7	56,1	73,0	72,6	71,5
Milho	66,0	67,8	68,2	77,3	78,7	78,7
Soja	69,5	68,1	68,9	95,0	94,0	95,1

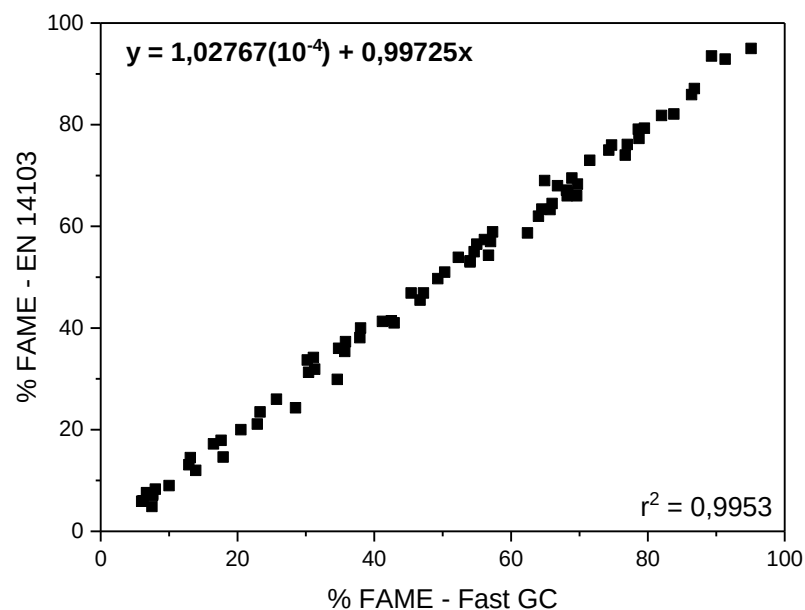
Fonte: Autor, 2020.

Figura 15: Comparação das metodologias Fast GCRF e GCSCRF curta para análise de %FAME em amostras de biodiesel nas 5 faixas de concentração avaliadas.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 16: Comparação das metodologias Fast GCRF e EN 14103 para análise de %FAME em amostras de biodiesel nas 5 faixas de concentração avaliadas.



Fonte: Autor, 2020.

De acordo com os valores de coeficiente angular e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para as comparações (Figuras 18 e 19), os, de forma que,

$r^2 = 0,9962$ para a comparação *Fast* GCRF versus GCSCRF, e $r^2 = 0,9953$ para a comparação *Fast* GCRF versus EN14103:2011. Como os valores de $r^2 > 0,99$, o grau de concordância entre os valores obtidos nos três métodos cromatográficos é suficientemente significativo para estabelecer que o método de *Fast* GCRF é exato para a quantificação de FAMES em amostras de biodiesel.

Com base na análise de variância (ANOVA), os resultados obtidos nas três metodologias não apresentam diferença significativa a nível de 0,05 de significância de forma que, a hipótese nula, $H_0: \mu_{\text{Fast GC}} = \mu_{\text{GCSCRF}} = \mu_{\text{NORMA 14103}}$, foi aceita.

5.5.5 Exatidão: Ensaios de recuperação

Durante o estudo da precisão intermediária, a maior variação no desvio padrão foi obtida para o biodiesel do óleo de chia com concentração em FAMES $< 20\%$ ésteres. Dessa forma, parte dos estudos de recuperação foram realizados utilizando amostras de biodiesel metílico produzido a partir do óleo de canola e dendê com a menor faixa de concentração, $< 20\%$ ésteres, conforme consta nas Tabelas 17, 18, respectivamente. As demais amostras empregadas no estudo da exatidão, foram biodiesel produzido a partir de gordura de frango e do óleo de milho com concentração de ésteres na faixa de 60% – 80%, como apresentado nas Tabelas 19 e 20, respectivamente.

Tabela 17: Ensaios de recuperação com a amostra de biodiesel de CANOLA, fortificada com B100 metílico de canola em três níveis de concentração.

Massa da amostra (g)	B100 adicionado (g)	R ^a (%)	Recuperação (g)	Recuperação (%)	Recuperação Média (±1,6%)	SD ^b	RSD ^c (%)
0,1014	0,0324	35,0	0,0314	96,97	97,25	0,48	0,49
		35,0	0,0314	96,97			
		35,2	0,0317	97,80			
0,1084	0,0513	41,1	0,0492	95,83	98,11	2,19	2,23
		42,5	0,0514	100,19			
		42,9	0,0504	98,32			
0,1121	0,0704	48,8	0,0720	102,30	102,91	0,65	0,63
		49,0	0,0724	102,82			
		49,3	0,0729	103,60			

Fonte: Autor, 2020. Nota: ^a Rendimento em ésteres metílicos determinado em triplicata; ^b Desvio padrão; ^c Desvio padrão relativo.

Tabela 18: Ensaios de recuperação com a amostra de biodiesel de DENDÊ, fortificada com B100 metílico de dendê em três níveis.

Massa da amostra (g)	B100 adicionado (g)	R ^a (%)	Recuperação (g)	Recuperação (%)	Recuperação Média (±1,6%)	SD ^b	RSD ^c (%)
0,1119	0,0333	34,8	0,0308	105,37	107,41	1,97	1,83
		35,3	0,0358	107,55			
		35,7	0,0364	109,30			
0,1303	0,0552	38,9	0,0542	98,15	98,82	1,46	1,48
		39,6	0,0555	100,50			
		38,8	0,0540	97,81			
0,1150	0,0703	46,1	0,0696	98,94	98,59	0,40	0,40
		46,0	0,0694	98,67			
		45,8	0,0690	98,15			

Fonte: Autor, 2020.

Nota: ^a Rendimento em ésteres metílicos determinado em triplicata; ^b Desvio padrão; ^c Desvio padrão relativo.

Tabela 19: Ensaios de recuperação com a amostra de biodiesel de GORDURA DE FRANGO, fortificada com B100 metílico de dendê em três níveis.

Massa da amostra (g)	B100 adicionado (g)	R ^a (%)	Recuperação (g)	Recuperação (%)	Recuperação Média (±1,6%)	SD ^b	RSD ^c (%)
0,1077	0,0346	73,4	0,0409	118,43	115,83	2,5	2,1
		72,7	0,0399	115,55			
		72,2	0,0393	113,50			
0,1015	0,0513	77,2	0,0581	113,35	111,16	2,6	2,3
		75,5	0,0555	108,28			
		76,7	0,0574	111,86			
0,1036	0,0701	68,4	0,5738	82,40	86,16	3,4	4,0
		71,1	0,0625	89,15			
		70,2	0,0609	86,93			

Fonte: Autor, 2020.

Nota: ^a Rendimento em ésteres metílicos determinado em triplicata; ^b Desvio padrão; ^c Desvio padrão relativo.

Tabela 18: Ensaios de recuperação com a amostra de biodiesel de MILHO, fortificada com B100 metílico de dendê em três níveis.

Massa da amostra (g)	B100 adicionado (g)	R ^a (%)	Recuperação (g)	Recuperação (%)	Recuperação Média (±1,6%)	SD ^b	RSD ^c (%)
0,1033	0,0347	79,9	0,0314	90,62	93,00	2,21	2,38
		81,0	0,0330	94,99			
		80,6	0,0324	93,40			
0,1029	0,0538	79,3	0,0457	85,03	86,74	1,92	2,21
		79,8	0,0465	86,38			
		80,6	0,0478	88,82			
0,1042	0,0722	86,6	0,0732	101,46	101,68	4,57	4,49
		84,3	0,0702	97,22			
		88,6	0,0768	106,35			

Fonte: Autor, 2020.

Nota: ^a Rendimento em ésteres metílicos determinado em triplicata; ^b Desvio padrão; ^c Desvio padrão relativo.

Conforme encontrado na literatura, os valores encontrados para os ensaios de recuperação permaneceram dentro do intervalo estabelecido como critério de

desempenho interno no laboratório, de 70% a 130% (EPA, 2018), faixas de ensaios de recuperação para resíduos (entre 70 e 120%) e de amostras mais complexas, 50 – 120%, (RIBANI et al., 2004). Desta forma, o método é considerado exato.

Foi realizado o tratamento estatístico do estudo de recuperação aplicando o teste t de *student* com nível 95% de significância, de acordo com a seguinte equação 11:

$$|t_{\text{exp}}| = \frac{(\text{Rec}-100)\sqrt{n}}{S_{\text{Rec}}} \quad (11)$$

Onde, *Rec* é média das recuperações obtidas para *n* repetições; *100* é o valor da recuperação percentual desejada; *n* é o número de determinações; *S_{Rec}* é o desvio padrão das recuperações. Quando o valor de *t* obtido está dentro do intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para *n* - 1 graus de liberdade em dado nível de significância, o método é considerado exato (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

O valor calculado foi, $t_{\text{exp canola}} = 0,3294$, $t_{\text{exp dendê}} = 0,5555$, $t_{\text{exp gordura de frango}} = 0,48$, $t_{\text{exp milho}} = 1,52$, para o biodiesel do óleo de canola, dendê, gordura de frango e óleo de milho, respectivamente.

O valor $t_{\text{tabelado}} = 4,3$ com 95% de confiança e *n* - 1 graus de liberdade. Logo o método demonstrou ser exato para os ensaios de recuperação com o biodiesel do óleo de canola, dendê, gordura de frango e milho.

O desvio padrão relativo está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra (BRITO et al., 2003) e valores de 0% a 10% indicam relevante homogeneidade entre os dados experimentais (TIMBÓ, 2014). Neste caso, para as amostras submetidas aos ensaios de recuperação, todos os valores obtidos para RSD (Tabelas 17 – 20) demonstram que o método apresentou dados homogêneos e, consequentemente, foi considerado exato.

Geralmente, em análises de amostras traços ou impurezas, dependendo da complexidade da amostra, são permitidos RSD de até 20%. No caso de metodologias que quantificam compostos em macro quantidades admitem um RSD de 1 a 2%.

Como neste estudo foram empregadas amostras do tipo semi- micro, esperava-se erros maiores que 1 a 2%, logo o método *Fast* GCRF é exato.

5.6 Resumo das figuras de mérito avaliadas durante a validação da metodologia de *Fast* GCRF com fator de resposta e respectivos indicadores

Na Tabela 21, constam os parâmetros analisados para a validação da metodologia de *Fast* GCRF empregada na análise de biodiesel metílico e os resultados obtidos para cada propriedade:

Tabela 19: Figuras de mérito avaliadas no processo de validação da metodologia *Fast* GCRF aplicada à análise de biodiesel.

Figura de mérito	Método de análise	Indicadores
Seletividade	Comparação de cromatogramas	Seletivo
	Fator de seletividade	$\gamma > 1$
Precisão	Precisão Instrumental	$SD \leq 1,6^a$; $RSD \leq 2,3\%^a$
	Repetitividade	$SD \leq 1,1^a$; $RSD \leq 3,6\%^a$
	Precisão intermediária	$SD \leq 2,0^a$; $RSD \leq 3,4\%^a$
Robustez	Variações nas condições de preparo da amostra	Robusto
Exatidão	Comparação com métodos	$r^2 > 0,99$
	Ensaio de recuperação	82% – 122%; $RSD \leq 4,49\%^a$

Fonte: Autor, 2020.

Nota: ^aForam considerados os maiores valores para desvio padrão (SD) e Desvio padrão relativo (RSD) em cada tipo de avaliação da metodologia *Fast* GCRF proposta.

A Tabela 22 apresenta condições instrumentais propostas na metodologia de *Fast* GCRF, desenvolvida nesta tese, comparadas às propriedades aplicadas nos artigos utilizados como referências e base experimental.

Embora essas metodologias utilizadas como referência possuam tempos de análise reduzidos, Ragonese et al. (2009) e Sato et al. (2016) utilizaram coluna capilar de líquido iônico, a qual é sensível e apresenta valor elevado, enquanto que, as metodologias que empregam a técnica de *Ultrafast* GC exigem equipamentos de última geração equipados com um sistema de módulo de aquecimento ultrarrápido direto e detector de ionização de chama de alta frequência (FID com 300 Hz) e, devido ao elevado custo e maiores gastos com manutenção, estes equipamentos se tornam inacessíveis.

Além disso, nestes artigos destaca-se a utilização de métodos com colunas polares, que apresentam baixa resistência à elevada temperatura e oxidação e altas temperaturas (Tranchida et al., 2008; Mondello et al., 2006; Mondello et al., 2003).

Tabela 20: Comparação dos parâmetros instrumentais otimizados no desenvolvimento do método de *Fast GCRF*, proposto nesta tese, e parâmetros empregados nos artigos utilizados como base bibliográfica na análise de biodiesel por GC.

Referência	Metodologia	Fluxo do gás de arraste H ₂ (mL/ min)	Dimensões da coluna	Fase estacionária	Rampa de aquecimento do forno (°C)	Temp o (min)	Tipos de FAME
RAGONESE et al., 2009.	<i>Fast GC/FID</i>	0,78	12 m × 0,10 mm × 0,08 µm	Polar	50 – 230 (70 °C min ⁻¹)	2,6	1
SATO et al., 2016.	<i>Fast GC/FID</i>	0,65	14 m × 0,10 mm × 0,08 µm	Polar	160	3,0	5
MARQUES et al., 2010.	GC/FID	-	30 m × 0,53 mm × 1 µm	-	250	6,0	1
HUPP et al., 2018.	UFGC/FID	-	2 m × 0,32 mm × 0,2 µm	Apolar	40 (10 s) 40 – 396 (2 °C min ⁻¹)	4,8	7
TERCINI et al., 2018.	UFGC/FID	1,00	10 m × 0,15 mm × 0,15 µm	Polar	60 (0,1 min) 60 – 180 (300 °C min ⁻¹) (0,2 min) 180 – 250 (500 °C min ⁻¹) (0,66 min)	1,5	7
Autor, 2020.	<i>Fast GCRF-FID</i>	1,20	10 m × 0,1 mm × 0,1 µm	Apolar	60 – 360 °C (60 °C min ⁻¹)	5,0	15

Fonte, Autor, 2020.

5 CONCLUSÕES

O método *Fast* GCRF, desenvolvido nesta tese, emprega coluna capilar apolar (mais resistente e de baixo custo) e um cromatógrafo convencional mais acessível sob condições instrumentais adequadas para determinar FAME totais em biodiesel produzido a partir de 15 tipos de materiais graxos, isto é, uma gama maior de tipos de biodiesel quando comparado aos métodos encontrados na literatura.

O tempo total de análise do método *Fast* GCRF é de 5 min, porém, todos os analitos de interesse, inclusive o padrão interno, eluíram em até 4,5 min sem afetar a eficiência e seletividade do método. Dessa maneira, o método *Fast* GCRF apresenta tempo de análise menor que as metodologias empregadas no estudo da exatidão, sendo até 4 vezes menor que o método de GC com coluna curta e até 6 vezes menor que o método indicado pela ANP, EN 14103:2011.

6 PERSPECTIVAS

Diminuir o tamanho da coluna do método de *Fast* GCRF para diminuir o tempo de análise.

Aplicar a metodologia para biodiesel obtido com outros álcoois.

Desenvolver e validar a metodologia de *Fast* GCRF para quantificação de MAG, DAG e TAG em amostras de biodiesel de diferentes tipos de materiais graxos.

REFERÊNCIAS

ABID, M.; TOUZANI, A.; BENHIMA, R. Synthesis of biodiesel from chicken's skin waste by homogeneous transesterification. **International Journal of Sustainable Engineering**, v. 12, n. 4, p. 272–280, 2019.

ABREU, A. B. G. DE; MATTA, M. H. DE R. DA; MONTAGNER, É. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5–9, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Informações de Mercado - 2020** - Disponível em: <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>. Acesso em: 17 set de 2020, às 02:58.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução CNPE nº 16, de 29 de outubro de 2018; Despacho Nº 621, de 6.8.2019 - DOU 7.8.2019** - Disponível em: <http://www.anp.gov.br/noticias/5633-oleo-diesel-brasileiro-passa-conter-minimo-12-biodiesel>. Acesso em: 31 ago 2020, às 15:16.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução ANP Nº 45, de 25.8.2014**, 2014

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução ANP Nº 7, de 19.3.2008**, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, 2003.

AKANCHA; KUMARI, N.; SINGH, R. K. Co-pyrolysis of waste polypropylene and rice bran wax– production of biofuel and its characterization. **Journal of the Energy Institute**, v. 92, n. 4, p. 933–946, 2019.

AKBAR, E. et al. Characteristic and Composition of Jatropha Curcas Oil Seed from Malaysia and its Potential as Biodiesel Feedstock Feedstock. **European Journal of Scientific Research**, v. 29, n. 3, p. 396–403, 2009.

ALMEIDA, T. A. et al. Synthesis of ethyl biodiesel from soybean oil, frying oil and chicken fat, using catalysts based on vanadium pentoxide. **Energy**, v. 97, p. 528–533, 2016.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 2009.

ASLAN, S.; AKA, N.; KARAOGLU, M. H. NaOH impregnated sepiolite based heterogeneous catalyst and its utilization for the production of biodiesel from canola oil. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, p. 1–8, 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 15764. Biodiesel determination of total esters content by gas chromatography, Rio de Janeiro, 2012.

BLUMBERG, L. M. Theory of FAST CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY. Part 1: Column Efficiency. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 20, 597–604, 1997.

BRAUN, J. V. et al. GC/FID methodology validation for the fatty esters content determination in biodiesel with hexadecyl acetate as the internal standard. **Química Nova**, 2017.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CANESIN, E. A. et al. Characterization of residual oils for biodiesel production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39–45, 2014.

CARDENIA, V. et al. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 4, 1283–1292, 2018.

CARVALHO, M. S. et al. Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC/FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 763–769, 2012.

CHATTOPADHYAY, S.; DAS, S.; SEN, R. Rapid and precise estimation of biodiesel by high performance thin layer chromatography. **Applied Energy**, v. 88, n. 12, p. 5188–5192, 2011.

CRAMERS, C. A.; SCHERPENZEEL, G. J.; LECLERCQ, P. A. Increased Speed of Analysis in Directly Coupled Gas Chromatography-Mass Spectrometry Systems: Capillary columns at sub-atmospheric outlet pressures. **Journal of Chromatography**, v. 203, 207–216, 1981.

CRUZ-HERNANDEZ, C.; DESTAILLATS, F. Recent Advances in Fast Gas-Chromatography: Application to the Separation of Fatty Acid Methyl Esters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, 1672–1688, 2009.

DA SILVA, F. L. et al. Study of correlations between composition and physicochemical properties during methylic and ethylic biodiesel synthesis. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 18–26, 2017.

DA SILVA, F. L. **Validação de Metodologia Analítica Empregando Coluna Curta em Cromatografia Gasosa para a Determinação de Ésteres Alquílicos 2014-2016**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Maceió, p. 24. 2016. Tranchida, P. Q.; Mondello, M.; Sciarrone, D.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Evaluation of use

of a very short polar microbore column segment in high-speed gas chromatography analysis, **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 14, 2634–2639, 2008.

DAGAN, B. S.; AMIRAV, A. Fast, Very Fast, and Ultra-Fast Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Thermally Labile Steroids, Carbamates, and Drugs in Supersonic Molecular. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.7, 737–752, 1996.

DE JESUS, R. et al. Different Strategies to Anchor Organotin Methoxides on Silica and Their (Re)Use as Heterogeneous Catalysts for Transesterification Reactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

DEN BOEF, G.; HULANICKI, A. Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 553–556, 1983.

DESTAILLATS, F.; CRUZ-HERNANDEZ, C. Fast analysis by gas–liquid chromatography - Perspective on the resolution of complex fatty acid compositions. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p.175–178, 2007.

DESTY, D.H.; GOLDUP, A.; SWANTON, W.T. In: **Gas Chromatography**, Academic Press, p. 105, Nova Iorque, 1962.

DIAS, A. N. Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. **Fuel**, v. 94, p. 178–183, 2012.

DO SANTOS, P. D. et al. Authenticity investigation of bovine tallow for biodiesel production via mass spectrometry: a comparison with traditional methodology. **Chemical Papers**, v. 73, n. 4, p. 1013–1018, 2019.

DOMOTOROVA, M.; MATISOVA, E. Fast Gas Chromatography for Pesticide Residues Analysis. **Journal of Chromatography A**, 1207(1-2) 1–16, 2008.

EN 14103, EUROPEAN STANDARD; **Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters (FAME) – determination of ester and linolenic acid methyl ester contents**. European Committee for Standardization: Berlin, 2003.

EN 14103, EUROPEAN STANDARD; **Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters (FAME) – determination of ester and linolenic acid methyl ester contents**. European Committee for Standardization: Brussels 2011.Environmental Protection Agency. **SW-846 Test Method 8000D: Determinative Chromatographic Separations**. Estados Unidos da América, 2018. Disponível em: <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-8000d-determinative-chromatographic-separations>. Acesso em: 30 abril de 2020, às 02:46.

FAN, H.; WANG, B.; YUN, Z. The Determination of Fatty Acid Methyl Esters in Biodiesel from Rapeseed Oil by Gas Chromatography with a Packed Column.

Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, v. 34, n. 22, p. 2084–2091, 2012.

FARIA, R. C. M. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1900–1905, 2007.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 174–183, 2007.

Firestone, D. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Champaign: 1998.

FLOOD, M. E. et al. Analysis of Biodiesel Feedstock Using GCMS and Unsupervised Chemometric Methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 8, p. 1443–1452, 2014.

FOLAYAN, A. J. et al. Experimental investigation of the effect of fatty acids configuration, chain length, branching and degree of unsaturation on biodiesel fuel properties obtained from lauric oils, high-oleic and high-linoleic vegetable oil biomass. **Energy Reports**, v. 5, p. 793–806, 2019.

GAGLIERI, C. et al. Is Thermogravimetry an efficient alternative to gas chromatography in degree of biodiesel conversion? **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 135, n. 4, p. 2591–2597, 2019.

GAMA, P. E.; GIL, R. A. DA S. S.; LACHTER, E. R. Produção de biodiesel através de transesterificação in situ de sementes de girassol via catálise homogênea e heterogênea. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1859–1862, 2010.

GE, J. C. et al. Reducing volatile organic compound emissions from diesel engines using canola oil biodiesel fuel and blends. **Fuel**, v. 218, p. 266–274, 2018.

GELBARD, G. et al. ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with metanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, p. 1239–124, 1995.

GIARDINA, M.; MCCURRY, J. D. Comparison of Temperature Programmable Split/Splitless and Cool On-Column Inlets for the Determination of Glycerol and Glycerides in Biodiesel by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 683–688, 2016.

GIDDINGS, J. C. Theory of Minimum Time Operation in Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 34, 314–319, 1962.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1087–1096, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HARTMANN, C. et al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 2, p. 193–218, 1998.

HUPP, A. M. et al. Analysis of biodiesel-diesel blends using ultraFast gas chromatography (UFGC) and chemometric methods: Extending ASTM D7798 to biodiesel. **Fuel**, v. 231, p. 264–270, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. ABNT ISO/IEC 17000, 2005.

INTERNATIONAL VOCABULARY OF METROLOGY (IVM). **Basic and general concepts and associated terms**; Joint Committee For Guides In– JGCM 200; ed. 3; 2012.

KEERA, S. T.; EL SABAGH, S. M.; TAMAN, A. R. Castor oil biodiesel production and optimization. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 27, n. 4, p. 979–984, 2018.

KORYTÁR, P. et al. Practical Fast Gas Chromatography: Methods, Instrumentation and Applications. **Trends in Analytical Chemistry**, 21, 558–572, 2002.

KUMAR, N.; TOMAR, M. Influence of nanoadditives on ignition characteristics of KUSUM (*SCHLEICHERA OLEOSA*) biodiesel. **International Journal of Energy Research**, v. 43, n. 8, p. 3223–3236, 2019a.

KUMAR, R. V. et al. Production and characterization of biodiesel obtained from transesterification of lipid from goat tallow. **Journal of Environmental Biology**, v. 40, n. 4, p. 601–606, 2019b.

KUMAR, R.; DAS, N. Seed oil of *Jatropha curcas* L. germplasm: Analysis of oil quality and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 663–668, 2018.

KURNIASIH, E.; PARDI, P. Application of Response Surface Methodology for Biodiesel Synthesis Optimization Through Transesterification Reaction using h-zeolite/ki Heterogeneous Catalyst. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 536, p. 012033, 2019.

LANÇAS F. M. **Fundamentos de cromatografia gasosa**. Campinas: Átomo, 2017.

LECLERCQ, P. A. J. Optimum Performance of Capillary GC Columns as a Function of Column Diameter and Film Thickness Under Various Operating Conditions: Part II:

Computer Program Extensions for n-Alkane Solutes and Polydimethylsiloxane Phases. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 15, 531–534, 1992.

LECLERCQ, P. A.; CRAMERS, C. A. Optimum Performance of Capillary GC Columns as a Function of Tube Diameter and Film Thickness under Various Operating Conditions. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 8, 764–771, 1985.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Capinas: Átomo, 2008.

MARQUES, M. V. et al. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 978–980, 2010.

MATISOVA, E.; DOMOTOROVA, M. Fast Gas Chromatography and Its Use in Trace Analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 199–221, 2003.

MCCURRY, J. D. GC Analysis of Total Fatty Acid Methyl Esters (FAME) and Methyl Linolenate in Biodiesel Using the Revised EN14103:2011 Method. **Agilent Technologies**. 2012.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.

MEIRA, M. et al. Validation of LED spectrofluorimeter for determination of both biodiesel and nontransesterified residual cooking oil in diesel samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 726–730, 2015.

MENEGHETTI, S. M. P. et al. Evaluation of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the yield of fatty acid ethyl esters obtained by transesterification. **Energy and Fuels**, v. 29, p. 7343–7349, 2015a.

MENEGHETTI, S. M. P. et al. Parâmetros Físico-Químicos Para a Reação de Transesterificação: Estudos Envolvendo Biodiesel Metílico e Etílico de Soja. In: **Parâmetros Físico-Químicos Para os Processos de produção de Biodiesel**. MCTI/ RBTB, Cap. 2, p. 50-80, 2015b.

MILINA, R.; MUSTAFA, Z. Gas chromatographic investigations of compositional profiles of biodiesel from different origin. **Petroleum and Coal**, v. 55, n. 1, p. 12–19., 2013.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. ed 6, Pearson Education Limited, 2010.

MOGOLLÓN, N. et al. Exploratory Analysis of Biodiesel by Combining Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography and Multiway Principal Component Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016.

MONDELLO, L.; TRANCHIDA, P. Q.; COSTA, R.; CASILLI, A.; DUGO, P.; COTRONEO, A.; DUGO, G. Fast GC for the Analysis of Fats And Oils. **Journal of Separation Science**. v. 26, 1467–1473, 2003.

MONDELLO, L.; TRANCHIDA, P.; DUGO, P.; DUGO, G. Rapid, Micro-Scale Preparation and Very Fast Gas Chromatographic Separation of Cod Liver Oil Fatty Acid Methyl Esters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, n. 5, 1566–1570, 2006.

MORAES, M. S. A. et al. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) in the characterization of biodiesel/diesel blends: application to beef tallow biodiesel. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1188–1192, 2011.

MORALES, V. et al. Validation of a GC–IDMS method for the metrologically traceable quantification of selected FAMES in biodiesel. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 20, n. 5, p. 411–419, 2015.

MUNIZ, R. DE O. et al. Total glycerol analysis in biodiesel samples using solid phase extraction coupled with enzymatic-spectrophotometric determination. **Analytical Methods**, v. 11, n. 6, p. 767–773, 2019.

MUSHARRAF, S. G.; AHMED, M. A.; ZEHRRA, N. Quantification of FAMES in biodiesel blends of various sources by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 8, p. 3372–3378, 2015.

MUSTAFA, Z.; YORDANOV, D.; MILINA, R. GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF BIODIESEL BLENDS. **Oxidation Communications**, v. 39, n. 4, p. 3324–3335, 2016.

OKULLO, A. et al. Gas Chromatographic Determination of Glycerol and Triglycerides in Biodiesel from Jatropha and Castor Vegetable Oils. **Advanced Materials Research**, v. 824, p. 436–443, 2013.

OLIVEIRA, D. M. DE et al. Transesterification double step process for biodiesel preparation and its chromatographic characterization: oils and fats in practical organic chemistry. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 734–737, 2013.

PARDO, V. L. et al. Development and Validation of a Method for the Determination of Fatty Acid Methyl Ester Contents in Tung Biodiesel and Blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 4, p. 631–637, 2012.

PARK, S. H. et al. Biodiesel Production from Locally Sourced Restaurant Waste Cooking Oil and Grease: Synthesis, Characterization, and Performance Evaluation. **ACS Omega**, v. 4, n. 4, p. 7775–7784, 2019.

PASA, T. L. B. et al. Assessment of commercial acidic ion-exchange resin for ethyl esters synthesis from *Acrocomia aculeata* (Macaúba) crude oil. **Renewable Energy**, v. 146, p. 469–476, 2020.

PEREIRA, E. et al. Development and validation of analytical methodology by GC/FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content. **Journal of Chromatography B**, v. 1093–1094, p. 134–140, 2018.

PINTO, A. C. et al. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313–1330, 2005.

PRADOS, C. P. et al. Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. **Fuel**, v. 96, p. 476–481, 2012.

PURANDARADAS, A. et al. Development and quantification of biodiesel production from chicken feather meal as a cost-effective feedstock by using green technology. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 14, p. 133–139, 2018.

RAGONESE, C. et al. Conventional and *Fast* gas chromatography analysis of biodiesel blends using an ionic liquid stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8992–8997, 2009.

RASHID, U.; ANWAR, F. Production of biodiesel through optimized alkal. **Fuel**, v. 87 p. 265–273, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROCABRUNO-VALDÉS, C. I. et al. An electrochemical study of the corrosion behaviour of metals in canola biodiesel. **Corrosion Engineering, Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 153–162, 2018.

ROCHA, C. P.; DE SOUSA, L. C.; ROCHA, E. D. Análises de óleos vegetais e óleo residual bruto por cromatografia gasosa visando à produção do biodiesel. **Conexão Ciência (Online)**, v. 8, n. 1, p. 85–91, 2013.

ROCHA, W. F. DE C.; SHEEN, D. A. Determination of physicochemical properties of petroleum derivatives and biodiesel using GC/MS and chemometric methods with uncertainty estimation. **Fuel**, v. 243, p. 413–422, 2019.

ROCHELEAU, M.J.; TITLEY, M.; BOLDUC, J. Measuring Residual Solvents in Pharmaceutical Samples Using Fast Gas Chromatography Techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 805, n.1, 77–86, 2004.

ROCKEMBACH, C. T. et al. Synthesis of Biodiesel from Grape Seed Oil Using Ultrasound Irradiation. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, 2014.

RUPPEL, T. et al. Free and Total Glycerol in B100 Biodiesel by Gas Chromatography According to Methods EN 14105 and ASTM® D6584 – Application note. **PerkinElmer Life and Analytical Sciences**, 2012.

RUPPEL, T.; GERALD, H. Free and Total Glycerin in B100 Biodiesel by Gas Chromatography – Application report. **PerkinElmer Life and Analytical Sciences**, 2006.

RUSSO, M. V. Fast Headspace Analysis with Short Microcapillary Columns. **Chromatographia**, v. 41, 419–423, 1995.

SAMAT, A. F. et al. The Potential of Biodiesel Production derived from Fish Waste. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 318, p. 012017, 2018.

SANEK, L.; PECHA, J.; KOLOZNIK, K. Simultaneous determination of main reaction components in the reaction mixture during biodiesel production. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 1029–1036, 2013.

SANTOS, REGINA. C. R.; VIEIRA, R. B.; VALENTINI, A. Monitoring the conversion of soybean oil to methyl or ethyl esters using the refractive index with correlation gas chromatography. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 46–50, 2013.

SATO, R. T. et al. *Fast GC/FID method for monitoring acidic and basic catalytic transesterification reactions in vegetable oils to methyl ester biodiesel preparation.* **Química Nova**, 2016.

SCHAEFER, W. **Shorthand formula of a fat trigly ceride molecule**. Wikimedia Commons, 2005. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fat_triglyceride_shorthand_formula.PNG. Acesso em: 02 nov de 2019, às 22:57.

SCHOBER, S. et al. A method for the determination of polyunsaturated fatty acid methyl esters in biodiesel: Results of an interlaboratory study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 8, p. 829–834, 2009.

SCHUTJES, C. P. M. et al. Increased Speed of Analysis in Isothermal and Temperature-Programmed Capillary Gas Chromatography by Reduction of the Column Inner Diameter. **Journal of Chromatography A**, v. 253, 1–16, 1982.

SELVARAJ, R. et al. Microwave mediated production of FAME from waste cooking oil: Modelling and optimization of process parameters by RSM and ANN approach. **Fuel**, v. 237, p. 40–49, 2019.

SEQUINEL, R. et al. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2226–2232, 2010.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 2003.

SHAPAVAL, V. et al. Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 140, 2019.

SHASHKOV, M. V.; SIDELNIKOV, V. N.; BRATCHIKOVA, A. A. New Stationary Ionic Liquid Phases with Quinolinium Cations for Capillary Gas Chromatography. **Analytical Letters**, p. 1–18, 2019.

SILVA, F. et al. Determination of Alkyl Esters Content by Gas Chromatography: Validation of Method Based on Short Column and Response Factor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1336–1343, 2018.

SINGH, D. et al. Response Factor Correction for Estimation of Ester Content in Biodiesel. **Chromatographia**, v. 77, n. 1–2, p. 165–169, 2014.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Cengage Learning, 2006.

SOUZA, G. K. et al. Synthesis of ethyl esters from crude macauba oil (*Acrocomia aculeata*) for biodiesel production. **Fuel**, v. 165, p. 360–366, 2016.

SUGANYA, T.; NAGENDRA GANDHI, N.; RENGANATHAN, S. Production of algal biodiesel from marine macroalgae *Enteromorpha compressa* by two step process: Optimization and kinetic study. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 392–400, 2013.

TAMILALAGAN, A.; SINGARAM, J. Oxidation stability of yeast biodiesel using Rancimat analysis: validation using infrared spectroscopy and gas chromatography–mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 3, p. 3075–3090, 2019.

TERCINI, A. C. B. et al. UltraFast gas chromatographic method for quantitative determination of total FAMES in biodiesel: An analysis of 90 s. **Fuel**, v. 222, p. 792–799, 2018.

THOAI, D. N. et al. A Novel Chemical Method for Determining Ester Content in Biodiesel. **Energy Procedia**, v. 138, p. 536–543, 2017.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p.835, 2002.

TIJSEN, R.; VAN DEN HOED, N.; VAN KREVELD, M. E. Theoretical Aspects and Practical Potentials of Rapid Gas Analysis in Capillary Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 7, 1007–1015, 1987.

TIMBÓ, F. B. **ABC da Bioestatística**. Maceió: Edufal, 2014.

VAN DEURSEN, M.; BEENS, M. J.; CRAMERS, C. A. Possibilities and Limitations of Fast Temperature Programming as a Route towards Fast GC. **Journal of High Resolution Chromatography**, 22, 509–513, 1999.

VAN YSACKER, P. G. et al. High-Speed GC/MS Using Narrow-Bore Columns and Ion Trap Detection. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 5, 413–419, 1993.

VAN YSACKER, P. G. et al. High-Speed Narrow-Bore Capillary Gas Chromatography in Combination with a Fast And Double-Focusing Mass Spectrometer. **Journal o High Resolution Chromatography**, 18, 517–524, 1995.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

VIJAYAN, S. K. et al. Winterization studies of different vegetable oil biodiesel. **Bioresource Technology Reports**, v. 1, p. 50–55, 2018.

VISENTAINER, J. V. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 274–279, 2012.

WOLLNIK, H. et al. A High-Speed Gas Chromatograph Coupled to a Time-of-Flight Mass Analyzer. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, 130, L7–L11, 1994.

ZHANG, H. et al. Lipases immobilized on the modified polyporous magnetic cellulose support as an efficient and recyclable catalyst for biodiesel production from Yellow horn seed oil. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1246–1254, 2020.

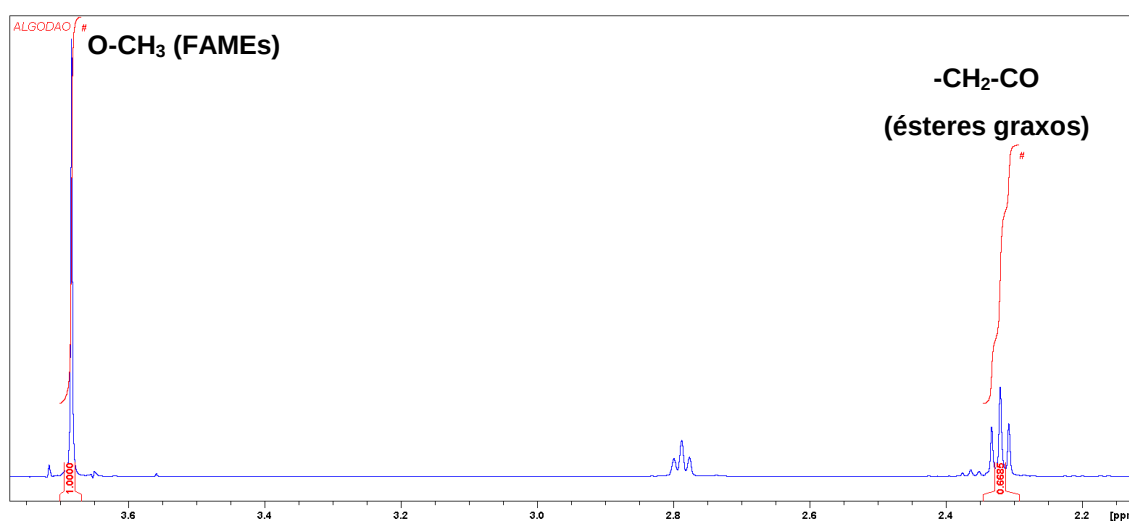
ZHOU, L. et al. A detailed kinetic study on oxidation of benzyl alcohol. **Combustion and Flame**, v. 207, p. 10–19, 2019.

ANEXO 1

INTEGRAÇÃO DAS ÁREAS DOS SINAIS OBTIDOS NAS ANÁLISES DE RMN ^1H

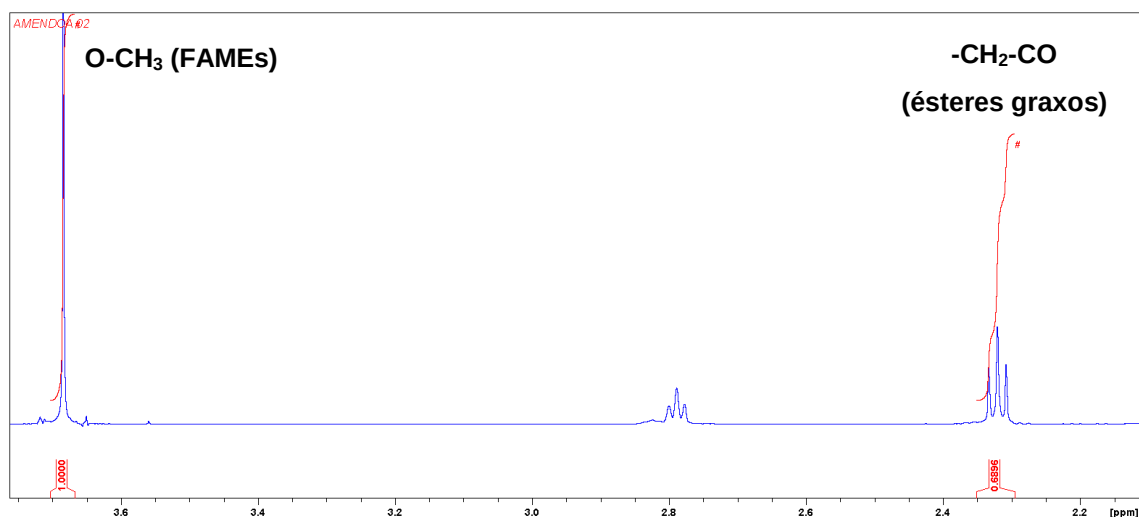
Nas figuras 1 – 15, constam os espectros para cada tipo de B100, produzido e aplicado no desenvolvimento da metodologia de *Fast GC*, e a integração das áreas dos sinais referentes ao próton do grupo metóxido da estrutura molecular dos ésteres metílicos de ácido graxos (3,7 ppm) formado através da reação de transesterificação, assim como, a integração do sinal referente ao grupo metil-carbonila da cadeia dos derivados de ésteres graxos (2,3 ppm).

Figura 1: Espectro de em RMN ^1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de algodão em FAMES.



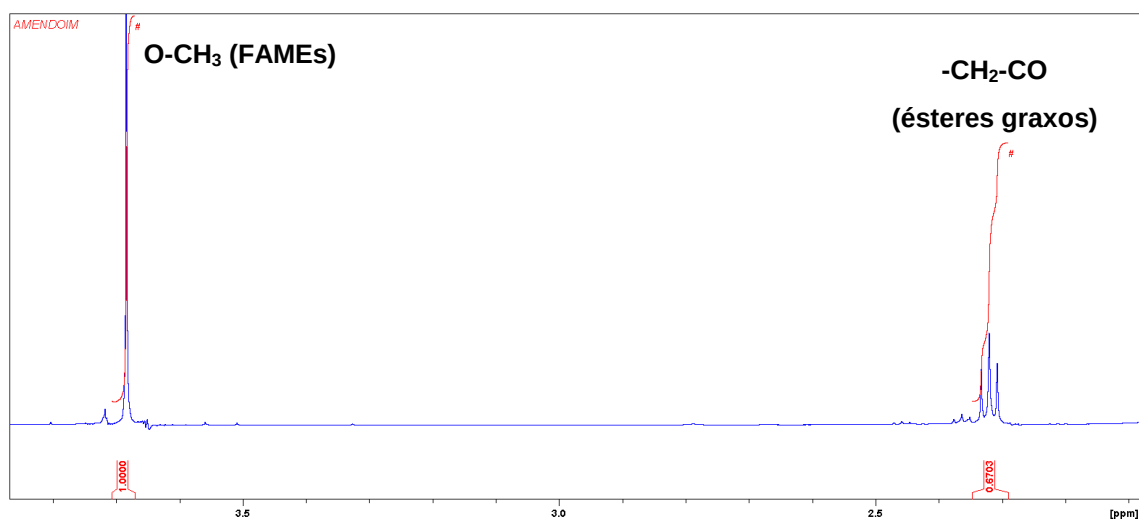
Fonte: Autor, 2020.

Figura 2: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de amêndoa em FAMES.



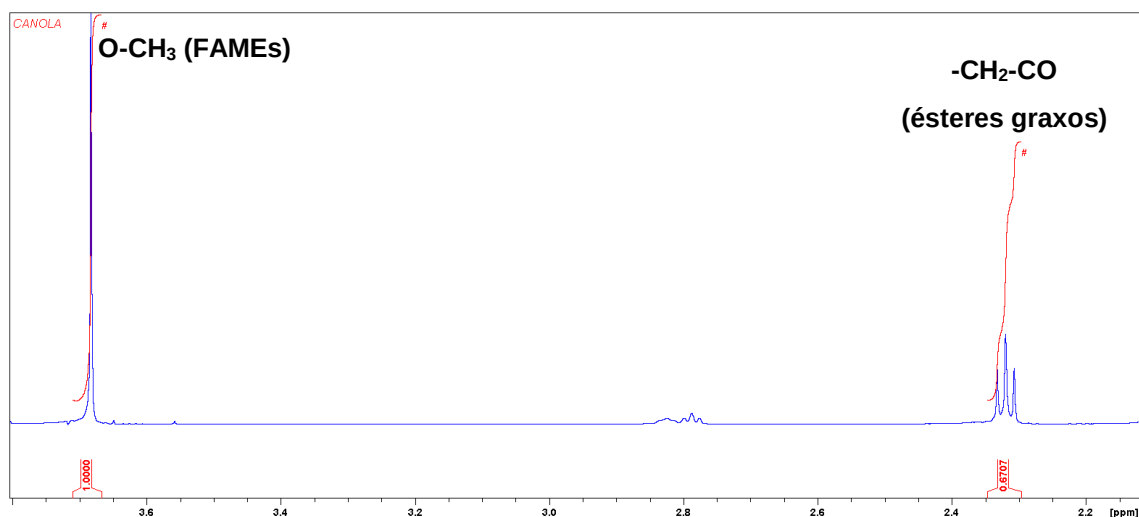
Fonte: Autor, 2020.

Figura 3: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de amendoim em FAMES.



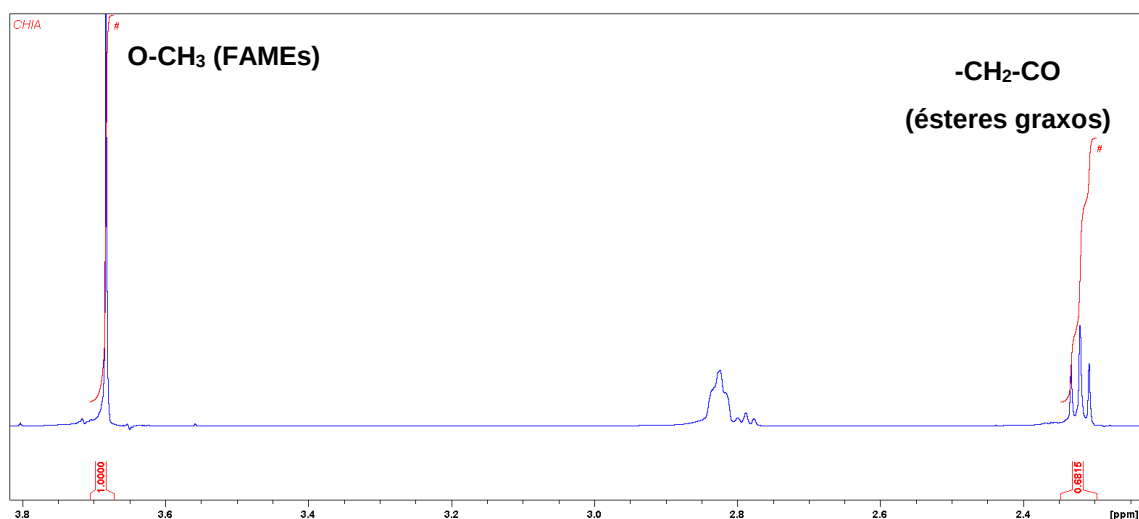
Fonte: Autor, 2020.

Figura 4: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de canola em FAMES.



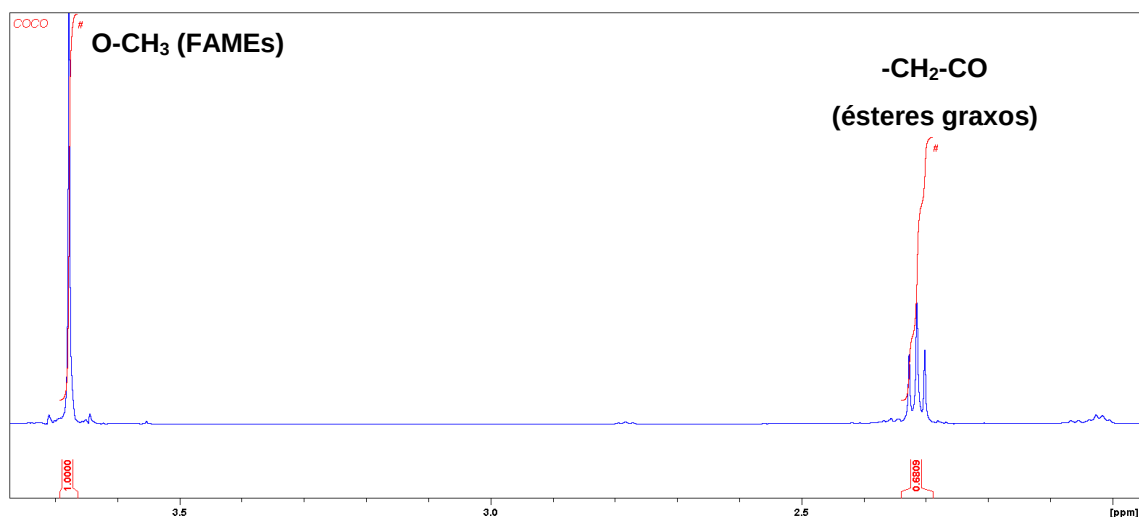
Fonte: Autor, 2020.

Figura 5: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de chia em FAMES.



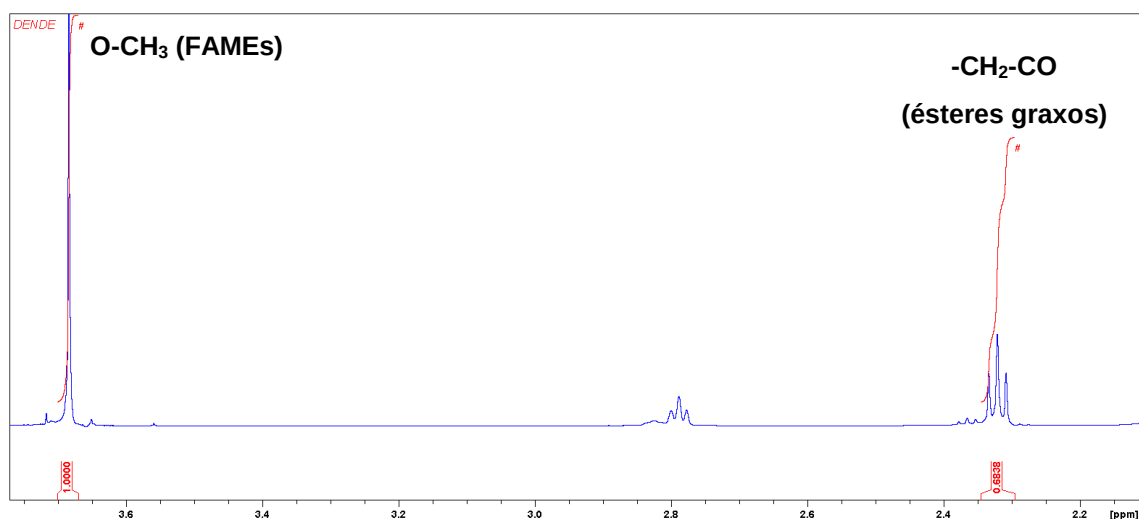
Fonte: Autor, 2020.

Figura 6: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de coco em FAMES.



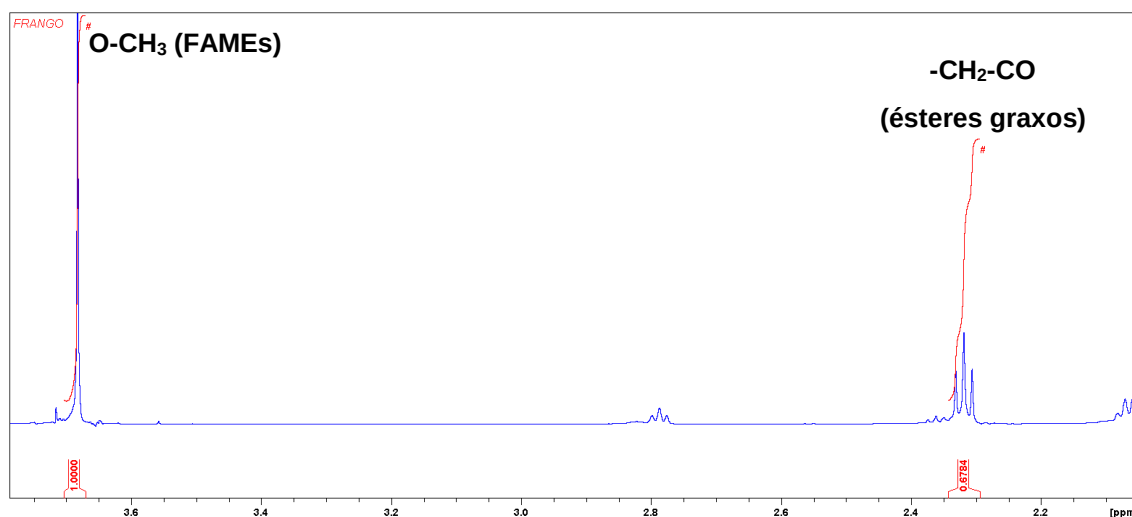
Fonte: Autor, 2020.

Figura 7: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de dendê em FAMES.



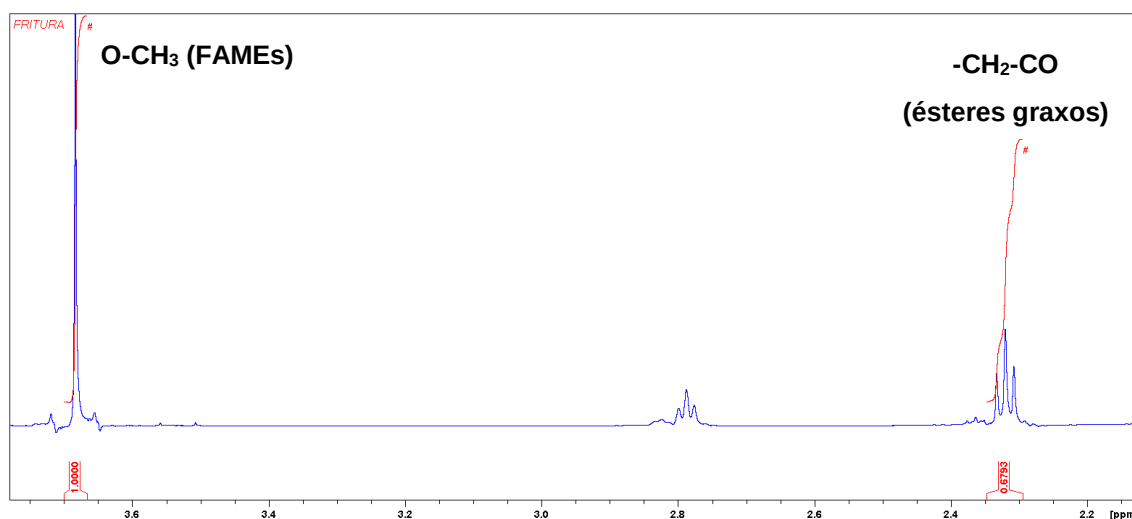
Fonte: Autor, 2020.

Figura 8: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão da gordura de frango em FAMES.



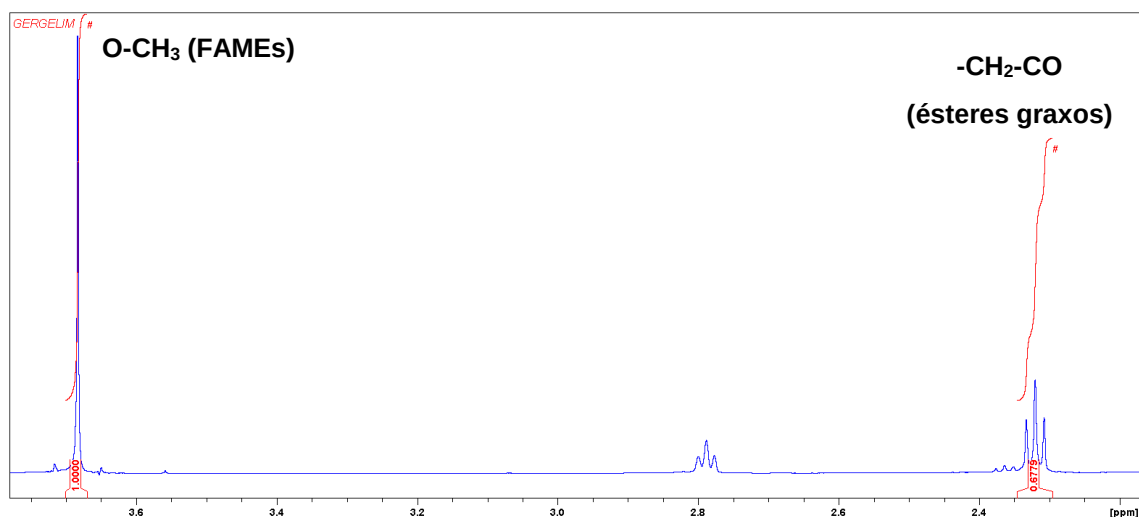
Fonte: Autor, 2020.

Figura 9: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo residual de fritura em FAMES.



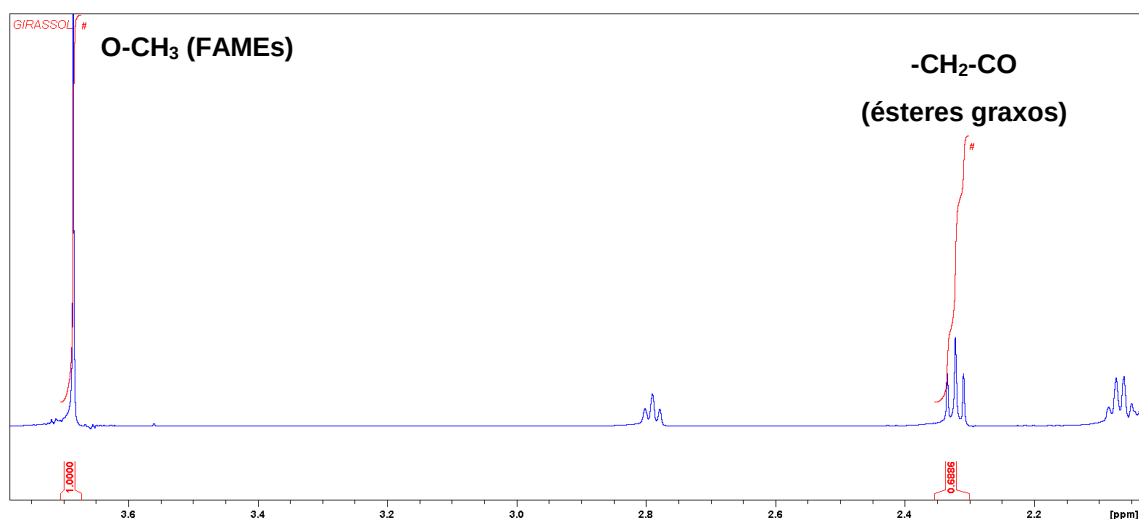
Fonte: Autor, 2020.

Figura 10: Espectro de em RMN ^1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de gergelim em FAMES.



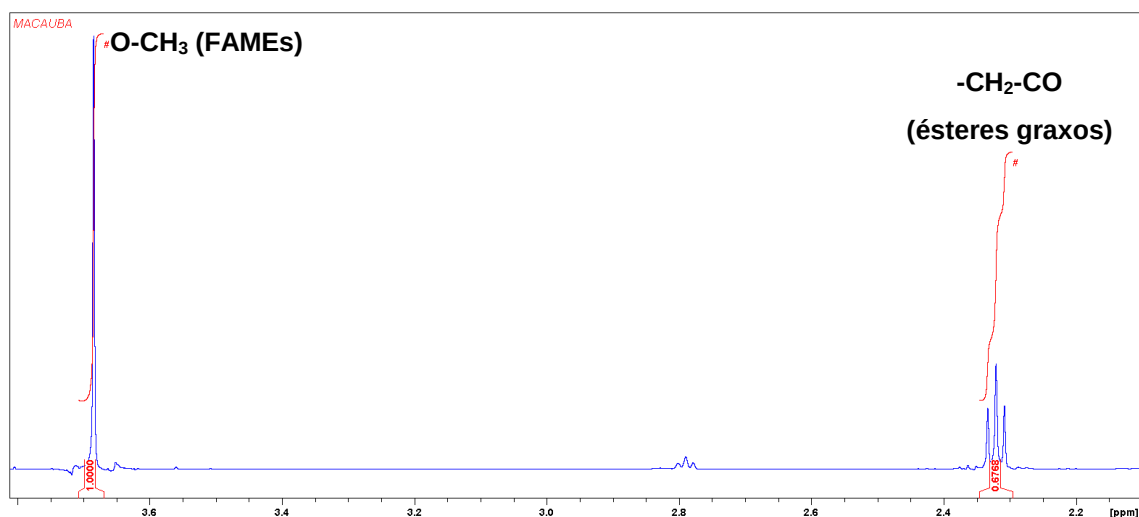
Fonte: Autor, 2020.

Figura 11: Espectro de em RMN ^1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo residual de girassol em FAMES.



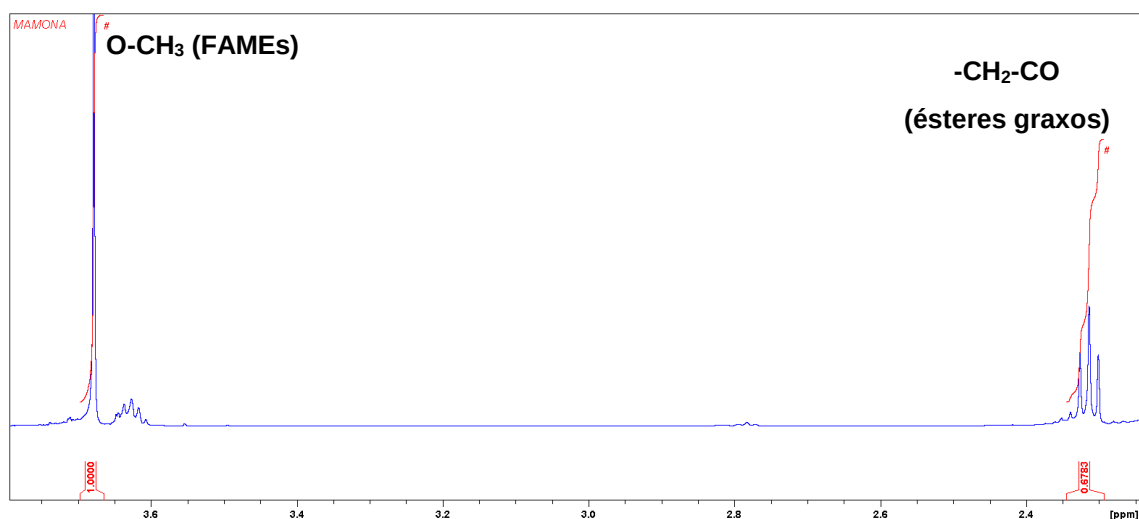
Fonte: Autor, 2020.

Figura 12: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de macaúba em FAMES.



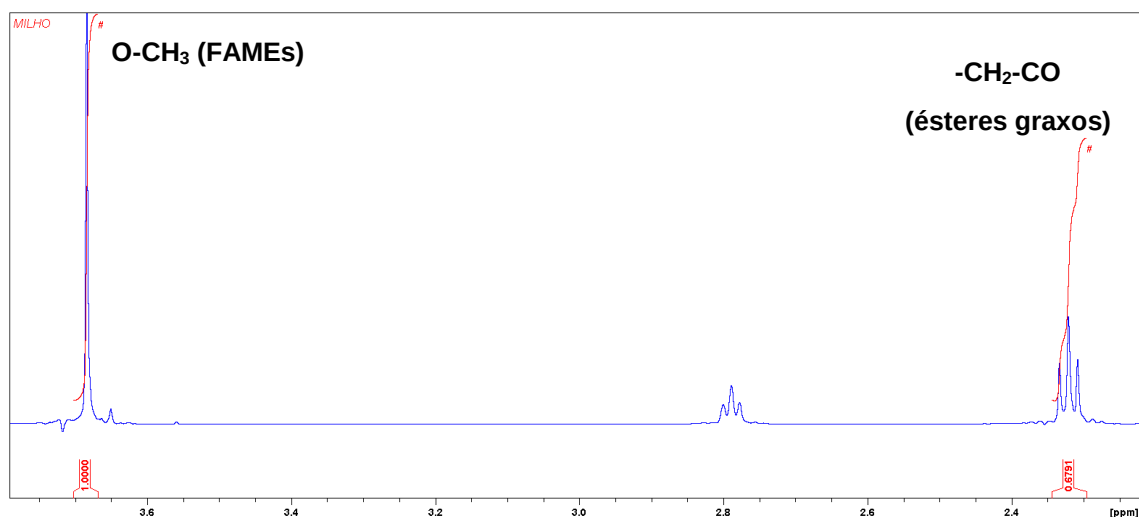
Fonte: Autor, 2020.

Figura 13: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de mamona FAMES.



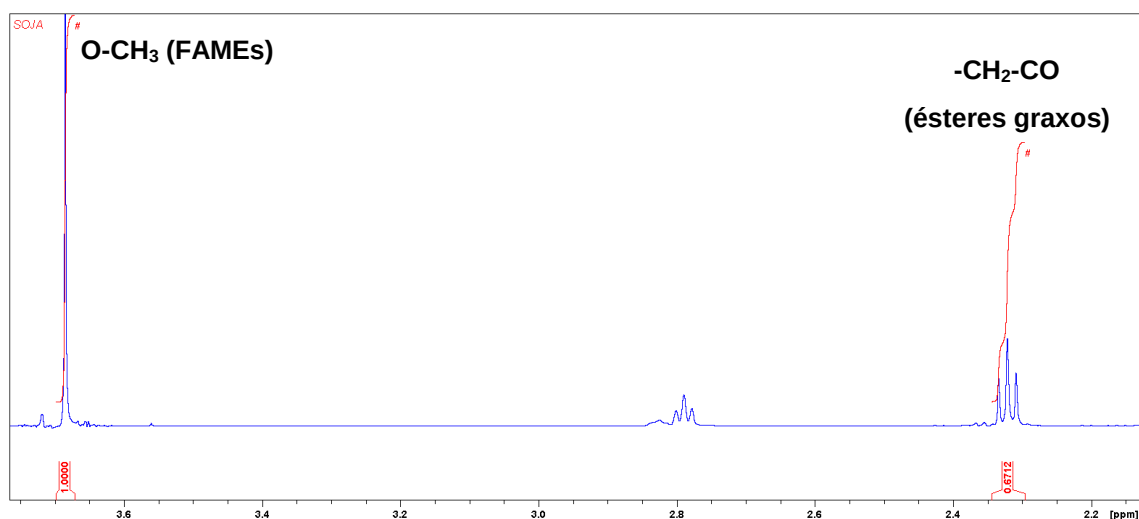
Fonte: Autor, 2020.

Figura 14: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de milho em FAMES.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 15: Espectro de em RMN 1H e integração das áreas dos sinais utilizados para determinar a porcentagem de conversão do óleo de soja em FAMES.



Fonte: Autor, 2020.

ANEXO 2



<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170232>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 29, No. 6, 1336-1343, 2018
Printed in Brazil - ©2018 Sociedade Brasileira de Química

Article

Determination of Alkyl Esters Content by Gas Chromatography: Validation of Method Based on Short Column and Response Factor

Filipe L. Silva,^a Lucas N. Melo,^a Carlos R. Wolf,^{b,c} Simoni M. P. Meneghetti^a and Janaína H. Bortoluzzi^{*,a}

^a*Grupo de Catálise e Reatividade Química, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Avenida Lourival de Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, 57072-970 Maceió-AL, Brazil*

^b*Faculdade de Química, Universidade Luterana do Brasil, Avenida Farroupilha, 8001, 92425-900 Canoas-RS, Brazil*

^c*TANAC S.A., Rua Torbjorn Weibull, 199, 95780-000 Montenegro-RS, Brazil*

In this study an analytical method, based on gas chromatography with flame ionization detection, using a short column and response factor (GCSCRF), was validated for the quantification of fatty acid alkyl esters (methyl or ethyl). During the validation process, the proposed method was employed to analyze twenty samples of fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters. Biodiesel samples were produced from soybean oil and the validated method was found to be selective, being able to separate and identify every ester species present in the samples according to its carbon number. When the method was submitted to some variations in the sample preparation procedure, it remained robust. Limits of detection and quantification were 6.76 and 20.4 mg mL⁻¹, respectively. The suggested method also showed great precision when successive analyses were carried out for different analysts, with standard deviation (SD) 0.6 for repeatability and relative standard deviation (RSD) percentage 7.3% for intermediate precision, excellent accuracy when compared to other reference methods (EN 14103 and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV)) and recovery studies.

Keywords: biodiesel, gas chromatography, chromatographic column, response factor

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170232>