

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

FILIPPE LINS DA SILVA

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO COLUNA CURTA
EM CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES
ALQUÍLICOS

Maceió – AL

2016

FILIPPE LINS DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO COLUNA CURTA
EM CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES
ALQUÍLICOS**

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

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Simoni M. P. Meneghetti

Maceió – AL

2016

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

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

S586v Silva, Filipe Lins da.
Validação de metodologia analítica empregando coluna curta em
Cromatografia / Filipe Lins da Silva. – 2016.
92 f. : il., grafs., tabs.

Orientadora: Janaína Heberle Bortoluzzi.
Coorientadora: Simoni M. P. Meneghetti.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de
Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 86-92.

1. Cromatografia gasosa - Fator resposta. 2. Ésteres metílicos. 3. Ésteres
etílicos. I. Título.

CDU: 543.544



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/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO


Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **FILIPE LINS DA SILVA**, intitulada: “**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO COLUNA CURTA EM CROMATOGRÁFIA GASOSA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 23 de fevereiro de 2016, às 9h, na Sala de Aula do LASSOP.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dra. Janaina Herbele Bortofuzzi
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dra. Simoni Margareti Plentz Meneghetti
Coorientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. João Inácio Soletti
(CTEC/UFAL)


Prof. Dr. Wander Gustavo Botero
(PPGQB/UFAL-Arapiraca)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por tudo. Por todas as oportunidades, desafios, vitórias, por me sustentar física e espiritualmente durante toda a minha trajetória acadêmica, profissional, e me tornar capaz de seguir adiante com meus objetivos.

Aos meus pais, **Manoel Silva** e **Noeme Silva**, e as minhas irmãs, **Patrícia Silva** e **Jeane Silva**, sou eternamente grato por sempre motivarem e cooperarem de forma incondicional para a minha formação como ser humano e profissional.

A minha orientadora, **Dr^a. Janaína Heberle Bortoluzzi** e coorientadora, **Dr^a. Simoni Margareti Plentz Meneghetti** por todo incentivo, confiança e por compartilhar conhecimentos, seja na sala de aula ou na bancada do laboratório. Agradeço também pelo companheirismo, amizade, e pelas oportunidades, as quais me foram concedidas e que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos demais professores e alunos membros do Grupo de Catálise e Reatividade Química, em especial, aos meus amigos **Jhosianna, Lucas, Michele** e **Cristian**, pelas amizades, incentivo e trabalho em equipe.

E aos professores, **Dr. João Inácio Soletti** e **Dr. Wander Gustavo Botero**, por terem aceitado o convite de participar da comissão julgadora e pela contribuição para melhoria deste trabalho.

RESUMO

O biodiesel, que é uma mistura de ésteres alquílicos produzidos a partir de óleos e gorduras vegetais ou animais, é um dos biocombustíveis mais produzidos atualmente e fonte de energia renovável alternativa aos combustíveis fósseis. Muitas metodologias tem sido aplicadas à análise de biodiesel em termos de ésteres alquílicos, neste contexto, foi validada uma metodologia analítica baseada em cromatografia gasosa com coluna curta, detecção por ionização em chama e com normalização interna com fator resposta para quantificar ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos. O método validado foi empregado à análise de biodiesel oriundo de diversas matérias primas, as quais foram previamente caracterizadas em relação à composição em ácidos graxos. Quando validado, o método em uso no laboratório, foi empregado à análise de vinte amostras de biodiesel metílico e vinte amostras de biodiesel etílico, produzidas a partir do óleo de soja e o mesmo demonstrou ser seletivo ao separar e identificar as espécies químicas presentes na amostra. Ao ser submetido à algumas variações no processo de preparo de amostra, o método manteve-se sensível e robusto. Com base nos parâmetros da curva analítica, os limites de detecção e quantificação foram, $LD = 0,0067 \text{ gmL}^{-1}$ e $LQ = 0,0204 \text{ gmL}^{-1}$. O método também apresentou ótima precisão quando realizadas análises sucessivas até mesmo por outro analista, excelente exatidão durante estudos de recuperação e quando comparado com outras metodologias. No estudo comparativo com metodologias de referência, o método foi comparado à metodologia baseada em cromatografia gasosa da Norma Europeia (EN 14103) indicada pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, e um método com base em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC–UV). Nestas comparações foi obtido o valor para o coeficiente de correlação, $r = 0,99$, para análises de biodiesel metílico de soja em ambas as situações de comparação. Quando comparados os resultados das análises de biodiesel etílico de soja, o método validado também apresentou $r = 0,99$, para a comparação com o método HPLC–UV e GC-EN 14103. No estudo de outras matérias-primas na produção de biodiesel, o método validado foi comparado com a metodologia EN 14103 e o método apresentou resultados de teor de ésteres metílicos compatíveis com os da Norma 14103 para o biodiesel metílico de algodão, dendê e girassol.

Palavras- chave: Cromatografia gasosa. Fator resposta. Ésteres metílicos. Ésteres etílicos.

ABSTRACT

Biodiesel is a mixture of alkyl esters produced from vegetable or animal oils and fats. It is one of the most currently produced biofuels and an alternative renewable energy source to fossil fuels. Many methods have been applied to biodiesel analysis in terms of alkyl esters. In this context, was validated an analytical methodology based on gas chromatography with a short column, detection by flame ionization and intern normalization with response factor to quantify the fatty acids (methyl and ethyl) esters. The validated method was used to analyze biodiesel produced from several raw materials, which were previously characterized with respect to the fatty acid composition. For validating the methodology in use at the laboratory, the method was employed for the analysis of twenty samples of methyl biodiesel and twenty samples ethyl biodiesel produced from soybean oil and this method demonstrated selectivity to separate and identify the chemical species present in the samples. When the method was submitted to some variations at the sample preparation process, the method remained sensitive and robust. Based on the parameters of the calibration curve, the limits of detection and quantification were $LD = 0.0067 \text{ gmL}^{-1}$ and $LQ = 0.0204 \text{ gmL}^{-1}$. The method also showed a great precision when carried out successive analyzes conducted by different analysts, an excellent accuracy when compared with other reference methods and during recovery studies. By comparing the results, the validated method was compared to two reference methodologies: a gas chromatography methodology based on the European standard (EN 14103) indicated by the National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels, and a method based on high-performance liquid chromatography (HPLC-UV). In these comparisons it was obtained the correlation coefficient, $r = 0.99$, for the methyl soybean biodiesel analyzes in both compare situations. By comparing the results of ethyl soybean biodiesel analyzes, the validated method presented an $r = 0.99$ to both situations, using the HPLC-UV and GC-EN 14103 methods. In the study of other raw materials at producing biodiesel, the validated method was compared with EN 14103 methodology and presented compatible results to the EN 14103 methodology for determining methyl esters content in biodiesel of cotton, sunflower and palm.

keywords: Gas Chromatography. Response factor. Methyl esters. Ethyl esters.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Estrutura de um triacilglicerídeo insaturado com radicais carboxílicos diferentes. | 19 |
| Figura 2 | Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil. | 22 |
| Figura 3 | Reação de transesterificação de triacilglicerídeos. | 24 |
| Figura 4 | Produção de biodiesel anual acumulada desde a mistura B5. | 27 |
| Figura 5 | Sistema de blocos de um cromatógrafo à gás. | 29 |
| Figura 6 | Sistema reacional empregado nas reações de transesterificação. | 44 |
| Figura 7 | Espectros de RMN H^1 para monitoramento da reação de transesterificação do óleo de soja. | 45 |
| Figura 8 | Cromatograma do biodiesel padrão de soja. C16 e C18: Mistura de ésteres metílicos contendo 16 carbonos e 18 carbonos, respectivamente; PI: Padrão interno Tricaprilina. | 48 |
| Figura 9 | Cromatograma referente a análise de uma mistura ésteres metílicos do biodiesel de colza por GC EN 14103. | 53 |
| Figura 10 | Cromatograma referente a análise de uma amostra de ésteres metílicos do biodiesel de soja por HPLC – UV. | 54 |
| Figura 11 | Cromatograma obtido com a análise de uma mistura de padrões C14:0-C18:3. | 57 |
| Figura 12 | Figura 12: Cromatograma obtido com a análise de uma mistura de padrões C16:0-C20:0. | 57 |
| Figura 13 | Espectros de RMN H^1 obtidos para o óleo de soja e para o biodiesel de soja metílico. | 59 |
| Figura 14 | Comparação dos cromatogramas obtidos com as injeções padrão interno tricapriline, hexano (solvente utilizado no preparo da amostra), óleo de soja, mistura B100:óleo de soja, B100 de soja etílico no método de cromatografia gasosa com coluna curta. | 60 |
| Figura 15 | Curva analítica obtida com 5 pontos experimentais de uma amostra padrão de B100 do óleo de soja. | 61 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 16 | Determinação gráfica das curva de linearidade através do gráfico da razão sinal/concentração versus concentração | 62 |
| Figura 17 | Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e EN 14103 para as análises do biodiesel metílico de soja em diferentes concentrações de ésteres. | 67 |
| Figura 18 | Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e HPLC- UV para as análises do biodiesel metílico de soja em diferentes concentrações de ésteres. | 67 |
| Figura 19 | Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e EN 14103 para as análises do biodiesel etílico de soja em diferentes concentrações de ésteres. | 70 |
| Figura 20 | Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e HPLC–UV para as análises do biodiesel etílico de soja em diferentes concentrações de ésteres. | 70 |
| Figura 21 | Comparação das metodologias de referência quanto a análise de biodiesel metílico de soja. | 71 |
| Figura 22 | Comparação das metodologias de referência quanto a análise de biodiesel etílico de soja. | 72 |
| Figura 23 | Cromatograma do B100 de óleo de algodão obtido no método de caracterização em termos de ácidos graxos. | 76 |
| Figura 24 | Cromatogramas de B100 de algodão, canola, coco, dendê e gordura de frango, analisados no método GC-coluna curta para quantificação de ésteres alquílicos. | 79 |
| Figura 25 | Cromatogramas de B100 de gergelim, girassol, mamona e milho, analisados no método GC-coluna curta para quantificação de ésteres metílicos. | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1 | Perfil de ácidos graxos de alguns tipos de óleos vegetais. | 20 |
| Tabela 2 | Reagentes empregados na produção de biodiesel e no preparo das amostras para. | 43 |
| Tabela 3 | Estudo da precisão do método GC-coluna curta através do teste da precisão intra-ensaio (repetitividade) com a amostra 2 de biodiesel metílico de soja; DP- Desvio padrão. | 63 |
| Tabela 4 | Estudo da precisão intermediária do método GC-coluna curta com a amostra de biodiesel metílico de soja de número 1; desvio padrão (S) desvio padrão relativo (RSD). | 64 |
| Tabela 5 | Modificações realizadas durante o teste da robustez do método e comportamento do rendimento reacional (%). | 65 |
| Tabela 6 | Comparação dos resultados, em % de ésteres metílicos do biodiesel de soja, obtidos nos métodos GC-coluna curta, EN 14103 e HPLC-UV. | 66 |
| Tabela 7 | Comparação dos resultados, em % de ésteres etílicos do biodiesel de soja, obtidos nos métodos GC-coluna curta, EN 14103 e HPLC-UV. | 69 |
| Tabela 8 | Ensaio de recuperação com a amostra 2 fortificada com B100 metílico de soja. | 73 |
| Tabela 9 | Figuras de mérito avaliadas no processo de validação da metodologia GC-coluna curta aplicada à análise de biodiesel metílico do óleo de soja. | 75 |
| Tabela 10 | Composição em ácidos graxos, determinada por GC, para os óleos avaliados durante o projeto. | 78 |
| Tabela 11 | Estudo comparativo do teor de ésteres metílicos em amostras de biodiesel de outras matérias primas analisadas no método GC-coluna curta e EN 14103. | 81 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AGL – Ácidos Graxos Livres

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS – “*American Oil Chemists' Society*” – Sociedade Americana de Oleoquímica

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

B100 – Biodiesel com 100% de composição em ésteres alquílicos

B5 – Mistura 95% óleo diesel e 5% biodiesel

B6 – Mistura 94% óleo diesel e 6% biodiesel

B7 – Mistura 93% óleo diesel e 7% biodiesel

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

FID – Detector de Ionização em Chama

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

GC - Cromatografia Gasosa

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

IEC – Comissão Eletrotécnica Internacional

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IR – Detector Infravermelho

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

PI – Padrão Interno

RANP – Resolução da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

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

SD – “*Standard Deviation*” – Desvio Padrão

TAG – Triacilglicerídeos

TLC – Cromatografia em Camada Fina

WCO – “*World Customs Organization*” – Organização Mundial das Alfandegas

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 17 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 17 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 | Biomassa | 18 |
| 3.1.1 | Constituição e aspectos físicos dos óleos e gorduras | 18 |
| 3.1.2. | Ácidos Graxos | 19 |
| 3.1.3. | Obtenção de óleos e gorduras vegetais ou animais..... | 21 |
| 3.1.4. | Utilização do óleo vegetal <i>in natura</i> como combustível | 22 |
| 3.2 | Métodos para obtenção de biodiesel | 23 |
| 3.2.1 | Reação de transesterificação do óleo de soja | 23 |
| 3.3 | Biodiesel | 25 |
| 3.4 | Metodologias para quantificação de ésteres alquílicos no biodiesel | 27 |
| 3.5 | Métodos de separação | 28 |
| 3.5.1 | Cromatografia gasosa (GC)..... | 28 |
| 3.5.1.1 | Aplicação da cromatografia gasosa para a análise de biodiesel | 30 |
| 3.5.1.2 | Padronização interna em cromatografia gasosa | 33 |
| 3.5.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 34 |
| 3.5.2.1 | Aplicação da cromatografia líquida na análise de biodiesel | 35 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3.6 | Validação de Metodologias Analíticas | 36 |
| 3.7 | Parâmetros de desempenho analítico para validação de métodos | 38 |
| 3.7.1 | Seletividade | 38 |
| 3.7.2 | Linearidade e Faixa de trabalho | 38 |
| 3.7.3 | Limite de detecção (LD)..... | 39 |
| 3.7.4 | Limite de quantificação (LQ)..... | 40 |
| 3.7.5 | Sensibilidade | 40 |
| 3.7.6 | Precisão..... | 41 |
| 3.7.7 | Robustez | 41 |
| 3.7.8 | Exatidão..... | 42 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 | Reagentes | 43 |
| 4.2 | Produção e caracterização das amostras padrão de biodiesel de soja | 44 |
| 4.3 | Produção de amostras de biodiesel metílico e etílico de soja com diferentes concentrações de ésteres alquílicos | 46 |
| 4.4 | Metodologia de coluna curta utilizado no laboratório do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) | 46 |
| 4.5 | Validação da metodologia de coluna curta utilizada no GCaR | 48 |
| 4.5.1 | Seletividade | 48 |
| 4.5.2 | Linearidade e faixa de trabalho | 49 |
| 4.5.3 | Limites de detecção e quantificação..... | 49 |
| 4.5.4 | Sensibilidade | 50 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.5.5 | Precisão..... | 50 |
| 4.5.6 | Robustez | 51 |
| 4.5.7 | Exatidão..... | 51 |
| 4.5.7.1 | Comparação de metodologias..... | 51 |
| 4.4.7.2 | Ensaio de recuperação..... | 54 |
| 4.6 | Aplicação da metodologia de coluna curta para a análise de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas | 55 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 5.1 | Validação do método de cromatografia gasosa com coluna curta..... | 58 |
| 5.1.1 | Caracterização dos padrões de biodiesel por RMN H ¹ | 58 |
| 5.1.2 | Caracterização dos padrões de biodiesel por cromatografia gasosa com coluna curta | 59 |
| 5.1.3 | Seletividade | 59 |
| 5.1.4 | Linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação | 60 |
| 5.1.5 | Precisão..... | 633 |
| 5.1.5.1 | Precisão intra-ensaio | 63 |
| 5.1.5.2 | Precisão intermediária | 64 |
| 5.1.6 | Robustez | 65 |
| 5.1.7 | Exatidão..... | 65 |
| 5.1.7.1 | Biodiesel metílico de soja | 66 |
| 5.1.7.2 | Biodiesel etílico de soja | 69 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1.7.3 | Ensaio de recuperação | 73 |
| 5.2 | Resumo das figuras de mérito avaliadas durante a validação da metodologia de coluna curta e respectivos indicadores | 75 |
| 5.3 | Aplicação da metodologia GC-coluna curta para a análise de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas | 76 |
| 5.3.1 | Determinação da composição dos óleos e gorduras em termos de ácidos graxos..... | 76 |
| 5.3.2 | Análises de amostras de biodiesel provenientes de outras matérias primas | 79 |
| 6 | CONCLUSÕES | 83 |
| 7 | PERSPECTIVAS | 85 |
| | REFERÊNCIAS..... | 86 |

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente crise energética devido ao elevado consumo dos combustíveis fósseis e degradação ambiental, tem-se buscado o desenvolvimento de combustíveis provenientes de fontes energéticas alternativas para suprir fontes com previsão de esgotamento no futuro como carvão, gás natural e petróleo. Um dos combustíveis alternativos mais promissores é o biodiesel, o qual é derivado a partir da reação de transesterificação de óleos e gorduras vegetais ou animais com álcool de cadeia carbônica curta, tais como metanol ou etanol (FARIA et al., 2007; SANTOS, 2013).

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos produzido principalmente por transesterificação, ou alcoólise, alcalina e, a identificação e quantificação destes é realizada por diversas técnicas analíticas, principalmente, cromatografia em fase gasosa – GC (do inglês, *gas chromatography*) e cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (do inglês, *High-performance liquid chromatography*). A GC é uma técnica com expressiva seletividade e é a mais utilizada nos países produtores de biodiesel (DAS, 2011; SOUSA et al., 2013).

No Brasil, o biodiesel é regulamentado e fiscalizado pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) que, em 2014, estabeleceu a Resolução de Nº 45, na qual está especificada a norma europeia EN14103 para a determinação do teor de ésteres metílicos (ANP, 2014).

Neste contexto, no presente trabalho, foi validada uma metodologia analítica baseada na técnica de cromatografia gasosa com coluna curta para a determinação de ésteres metílicos e etílicos provenientes de diversas matérias-primas.

Vários autores definem a validação de metodologias e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras, tais como, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, INMETRO, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (RIBANI et al., 2004).

A validação é o processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e

compartilhamento para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra (RIBANI et al., 2004).

Para a validação de novas metodologias, é necessário o estudo de uma série de propriedades analíticas e instrumentais, conhecidas como características ou parâmetros de desempenho analítico. As propriedades frequentemente encontradas para validação de metodologias de separação são: linearidade e faixa de aplicação; seletividade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação, sensibilidade e robustez (THOMPSON et al., 2002; RIBANI et al., 2004; SWARTZ, 2008; INMETRO, 2011).

A necessidade de se validar o método baseado em cromatografia gasosa com coluna curta, utilizado no Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR), é justificada pelo fato de que, neste grupo de pesquisa são desenvolvidos catalisadores, os quais muitas vezes são testados na reação de transesterificação para a obtenção de biodiesel. Como estes catalisadores estão em desenvolvimento as conversões em biodiesel muitas vezes são mínimas e, portanto, as normas já estabelecidas e publicadas não se adequam à esta aplicação. Além disto, a utilização desta metodologia validada como alternativa para a análise de biodiesel oriundo de diferentes matérias primas proporciona vantagens tais como, praticidade, melhor custo-benefício e menor tempo de análise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar uma metodologia baseada em cromatografia gasosa com coluna curta para análise de biodiesel.

2.2 Objetivos Específicos

Validar o método de cromatografia gasosa, em uso no laboratório GCaR para a determinação de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos provenientes de diferentes matérias-primas, através da avaliação das seguintes figuras de mérito: seletividade; faixa de trabalho; linearidade; limite de detecção; limite de quantificação; sensibilidade; exatidão; precisão e robustez.

Aplicação da metodologia analítica, validada, na análise de amostras de biodiesel provenientes de diversas matérias-primas e comparação da mesma com outras duas metodologias de referência, a Norma Europeia 14103, baseada em cromatografia gasosa e, uma metodologia desenvolvida por pesquisadores da Universidade de Brasília utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa

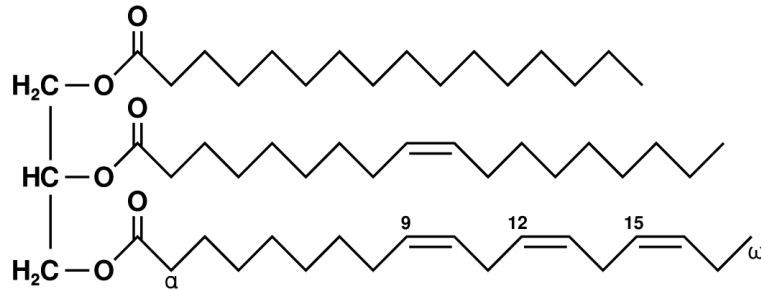
Biomassa é a matéria orgânica utilizada na produção de energia alternativa à obtida de recursos fósseis. O biodiesel, por sua vez, é produzido a partir de óleos e gorduras vegetais ou animais como, soja, mamona, dendê, girassol, babaçu, pinhão manso, sebo bovino, gordura de frango dentre outras. As vantagens do uso da biomassa na produção de energia são o baixo custo, o fato de ser renovável, permitir o reaproveitamento de resíduos e apresentar menor índice de poluição que outras fontes de energia como o petróleo e o carvão mineral (LOTERO, 2005; FERRARI, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

3.1.1 Constituição e aspectos físicos dos óleos e gorduras

Seja de origem animal ou vegetal, óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas, isto é, insolúveis em água, e são constituídos em maior parte (mais que 95% da constituição) por ésteres de triacilgliceróis também denominados triacilglicerídeos, resultantes da reação química de esterificação entre a molécula do glicerol e pequenas quantidades de mono- e di- acilgliceróis mais os ácidos graxos (MORETTO, 1998; LEHNINGER, 1995).

Os triacilgliceróis, ou triacilglicerídeos, (Figura 1) são compostos por três longas cadeias de ácidos graxos, os quais são ésteres quimicamente ligados a uma única molécula de glicerol e que diferem quanto ao comprimento das cadeias de carbono ao número e posição das insaturações, que são ligações duplas nestas cadeias. Assim, biodiesel refere-se a uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, obtidos principalmente por transesterificação ácida ou básica dos triacilglicerídeos com álcoois de cadeia curta (MEHER et al, 2004).

Figura 1 - Estrutura de um triacilglicerídeo insaturado com radicais carboxílicos diferentes.



Fonte: SCHAEFER, 2005.

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

As moléculas de triacilgliceróis podem apresentar de uma a quatro insaturações em cada uma das cadeias carbônicas dos grupos alquil e, à temperatura ambiente, os óleos são líquidos e, as gorduras são sólidas devido a sua maior constituição em ácidos graxos saturados. (GONZAGA, 2002).

3.1.2. Ácidos Graxos

Os ácidos graxos (AG) constituintes da biomassa glicerídica são ácidos carboxílicos livres ou esterificados e a maioria dos que constituem os óleos comestíveis possuem uma cadeia carbônica longa, de 16 a 18 átomos de carbonos, embora o óleo de coco apresente um alto teor de ácido láurico com apenas 12 átomos de carbono na sua constituição (GONZAGA, 2002; ZALIHA et al, 2003).

Os AG insaturados são as espécies mais reativas e de acordo com o número de ligações duplas na cadeia carbônica, os mesmos são classificados em mono-, di-, tri-, e poli-insaturados (VIANNI, 1996; REDA, 2007).

Os perfis de alguns tipos de óleos empregados na produção de biodiesel estão apresentados na Tabela 1 para ácidos graxo saturados e insaturados:

Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos de alguns tipos de óleos vegetais.

| ÓLEO | ÁCIDOS GRAXOS (% MASSA) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | C8:0 | C10:0 | C12:0 | C14:0 | C16:0 | C16:1 | C17:0 | C17:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | C:20:0 | C20:1 | C20:2 | C22:0 | C22:2 | C24:0 | C24:1 |
| CANOLA | - | - | - | 0,06 | 3,75 | 0,21 | C17:0 | - | C18:0 | 62,41 | 20,12 | 8,37 | C20:0 | C20:1 | 0,11 | 0,35 | - | 0,27 | 0,26 |
| MILHO | - | - | - | - | 10,47 | - | 0,04 | 0,05 | 1,87 | 24,23 | 60,38 | 0,99 | 0,64 | 1,54 | - | 0,76 | - | 0,15 | 0,20 |
| ALGODÃO | - | - | - | 0,77 | 21,87 | 0,47 | 0,08 | 0,11 | 2,02 | 16,61 | 56,35 | 0,33 | 0,39 | 0,28 | 0,10 | 0,36 | - | 0,12 | 0,16 |
| DENDÊ | - | - | - | 1,12 | 42,70 | - | 0,08 | 0,06 | 2,27 | 39,37 | 10,62 | 0,21 | 0,26 | 0,14 | - | 0,58 | - | 0,06 | 0,06 |
| GIRASSOL | - | - | - | 0,06 | 5,70 | - | 0,11 | 0,06 | 4,55 | 15,26 | 71,17 | 0,45 | 0,39 | 0,17 | 0,09 | 1,16 | 0,39 | 0,31 | - |
| SOJA | - | - | - | 0,06 | 9,90 | 0,08 | 0,04 | 0,08 | 4,79 | 21,35 | 56,02 | 7,15 | 0,30 | 0,22 | - | 0,48 | - | 0,21 | - |
| COCO | 6,38 | 5,56 | 45,46 | 18,82 | 10,08 | - | 0,10 | - | 3,94 | 7,45 | 1,80 | 0,06 | 0,41 | 0,22 | - | - | - | - | - |

Fonte: adaptado de ZAMBIAZI et al., 2007.

3.1.3. Obtenção de óleos e gorduras vegetais ou animais

Os diversos tipos de óleos vegetais são obtidos, geralmente, a partir das sementes de espécies vegetais pelo processo de prensagem, extração por solventes ou processos mistos. No Brasil existe uma grande diversidade de espécies oleaginosas das quais é possível extrair óleos vegetais, inclusive para utilização em sua matriz energética (PEIXOTO, 2010).

O processo de obtenção de gorduras de origem animal, inicia-se pela eliminação da umidade e de ácidos graxos livres pois, é necessário que o óleo apresente os menores valores possíveis de acidez e umidade para submeter esta matéria-prima à reação de transesterificação. A acidez pode ser eliminada através de uma reação de neutralização empregando uma solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio. Ocorre a saponificação dos ácidos graxos livres, formando uma borra que deve ser separada por decantação. Por fim, a gordura deve ser seca para remover a água e evitar a formação de reações paralelas que diminuem a eficiência do processo de transesterificação do óleo (BARROS, 2015).

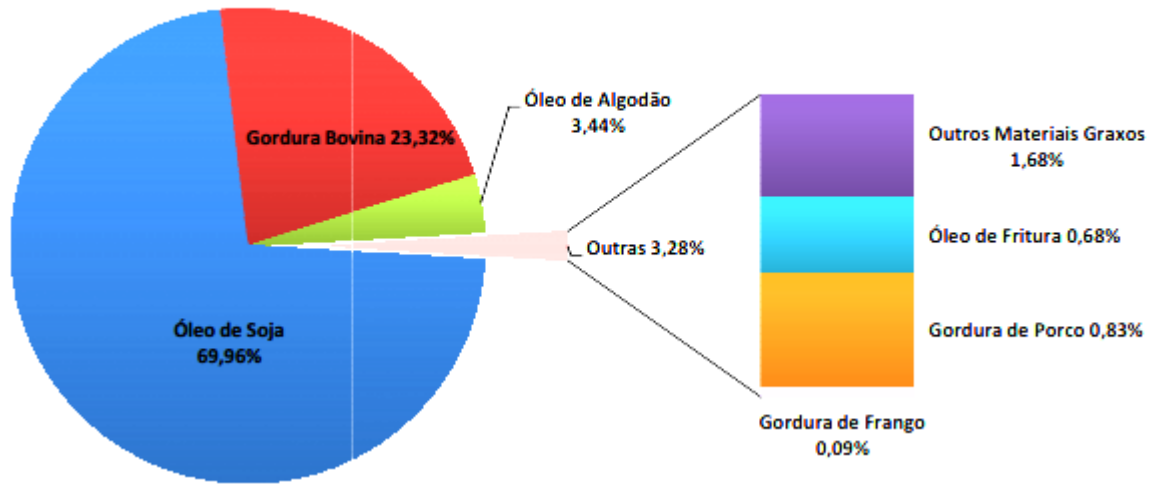
No caso de gordura de aves, a acidez desta matéria graxa pode ser diminuída através de uma extração com etanol, ou por uma reação de neutralização anterior à reação de transesterificação (BARROS, 2015).

A escolha da matéria-prima para a fabricação de biodiesel depende da disponibilidade e acessibilidade local. Por exemplo, o óleo de canola e de girassol são utilizados na União Europeia, enquanto que, o óleo de palma domina a produção de biodiesel em países tropicais. Nos Estados Unidos as gorduras animais e óleo de soja são as principais fontes de produção de biodiesel. O biodiesel brasileiro é produzido, principalmente, a partir do óleo de soja. (HAAS, 2005).

Na Figura 2 está apresentado o gráfico com a porcentagem de participação atual de cada matéria graxa empregada na produção de biodiesel no Brasil.

Figura 2 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.

Outubro/ 2015



Fonte: ANP, 2015

3.1.4. Utilização do óleo vegetal *in natura* como combustível

Embora em destaque no desenvolvimento de combustíveis alternativos, os óleos vegetais, podem gerar alguns danos ao motor, quando utilizado *in natura*, isto é, diretamente em motores ciclo-diesel, principalmente, no motor de injeção direta. Entre estes problemas operacionais, estão: menores volatilidades e a atomização inadequada do combustível ou de forma incompleta que provoca entupimento de orifícios, depósitos de carbono, espessamento e solidificação do óleo lubrificante, características de vaporização incorreta. A principal desvantagem do uso direto de óleos vegetais é a alta viscosidade, a qual é de 11 a 17 vezes maior do que a do diesel de petróleo, (MEHER, 2006). Por isso, métodos são necessários para a redução do valor da viscosidade cinemática do óleo, antes da utilização do mesmo como combustível. A reação de transesterificação é o método comumente empregado na transformação do óleo de soja em biodiesel, o qual tem menor viscosidade em relação ao óleo de partida.

3.2 Métodos para obtenção de biodiesel

Os óleos vegetais, como descritos anteriormente, não podem ser utilizados diretamente em motores a diesel, devido a sua elevada viscosidade. Os métodos geralmente empregados para a redução da viscosidade dos óleos vegetais são: misturá-los com o diesel, a emulsificação, a pirólise ou craqueamento, esterificação e a transesterificação (MENEGETTI et al., 2007).

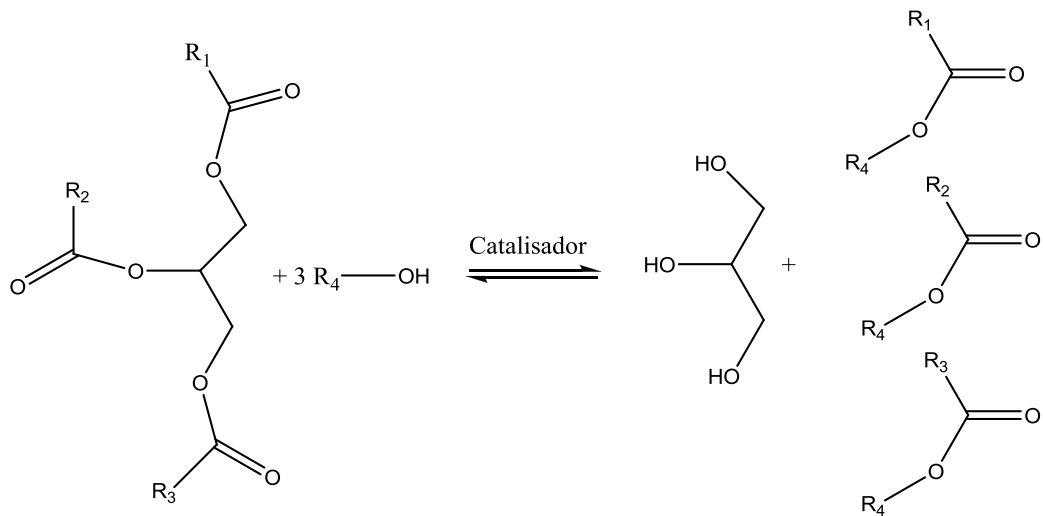
Dentre estes métodos, a reação de transesterificação de mono-, di- e triacilglicerídeos e, a reação de esterificação de ácidos graxos, são as principais tecnologias empregadas na produção de ésteres alquílicos de óleos e gorduras vegetais ou animais, biodiesel (KROHN et al, 2011).

A emulsificação é feita através da formação de micro emulsões usando como solventes, metanol, etanol ou butanol (GERIS et al, 2007) e, os processos de pirólise e craqueamento referem-se ao processo de hidrocrackeamento de óleos e gorduras, ou seja, a produção de hidrocarbonetos a partir de materiais graxos. (SUAREZ et al., 2009)

3.2.1 Reação de transesterificação do óleo de soja

O processo industrial de transesterificação de triacilglicerídeos (Figura 3) produz uma mistura constituída predominante de alquil ésteres, tri-, di- e mono-acilglicerídeos e, em menor parte, por glicerol, principal coproduto, álcool, catalisador e ácidos graxos livres (MEHER, 2006; PINTO, et al., 2005).

Figura 3 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos.



Fonte: Autor, 2016.

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

A reação de transesterificação é iniciada com o preparo do alcóxido dissolvendo-se o catalisador básico no álcool a ser empregado na reação de transesterificação e em seguida o óleo ou gordura reage com o alcóxido, de forma que, os grupos carbonilas dos acilglicerídeos sofrem um ataque nucleofílico pelo alcóxido. Mahajan (2006) propôs que:

Durante a reação, o óleo é lentamente difundido no metanol, onde o triacilglicerídeo é rapidamente convertido, em primeiro lugar para diacilglicerídeo, em seguida convertido em mono- acilglicerídeo e finalmente, para o glicerol. Em cada uma destas três etapas, uma molécula de éster metílico é produzida. Di- e mono- acilglicerídeos são surfactantes e é provável que exista uma emulsão de um curto período de tempo, o que pode melhorar a transferência de massa. No entanto, o subproduto glicerol é polar, e dentro de instantes, a fase glicerídica é separada dos outros produtos reacionais. Esta fase glicerídica extrai seletivamente os catalisadores, apresenta maior densidade e assenta no fundo do recipiente de reação. Portanto, a reação para, essencialmente, antes de atingir o grau necessário para conclusão (MAHAJAN, 2006).

O álcool para a reação é usado em excesso para deslocar o equilíbrio no sentido da formação de ésteres alquílicos, visto que, a reação de transesterificação

é, em partes, reversível. Além disso, comercialmente, óleos e gorduras contêm quantidades significativas de ácidos graxos livres (AGL), os quais causam o aumento da acidez dos produtos reacionais e reagem com o excesso de catalisador alcalino e formam produtos saponificados durante a reação (MEHER, 2006).

Um excesso de catalisador alcalino pode equilibrar a elevada acidez dos produtos reacionais, porém, o mesmo pode gerar a formação de sabão e conseqüentemente aumentar a viscosidade ou formar emulsões que interferem na reação impedindo a separação do glicerol do biodiesel (FREEDMAN, 1984).

A reação de transesterificação é mais rápida quando catalisada por uma espécie alcalina, como, hidróxidos de sódio e potássio (MEHER, 2006). Quando catalisada por ácidos de Brønsted, preferencialmente por ácido sulfônico e sulfúrico, a reação de transesterificação gera rendimentos muito elevados, alta proporção de ésteres alquílicos, mas, o processo da transesterificação com estes ácidos é muito lento, provoca corrosões e requer a utilização de temperaturas acima de 100 °C o que leva à maiores custos energéticos (SCHUCHARDT, 1998).

Devido a razões econômicas e de processo como proporcionar menor tempo reacional e elevada conversão de ésteres alquílicos de ácidos graxos, o álcool metílico é o mais empregado na transesterificação de óleos e gorduras. Porém, o etanol também pode ser utilizado desde que anidro, pois a presença de água inibe a reação, pela ocorrência de reações químicas indesejáveis como a hidrólise e a saponificação. Embora o uso do metanol apresente significativas vantagens, o etanol tem sua utilização favorecida por proceder de uma fonte renovável, o que diminui as preocupações com toxicidade e há maior disponibilidade no Brasil (MENEHETTI et al., 2007; SCHUCHARDT, 1998; MA, 1999).

3.3 Biodiesel

O biodiesel é o “combustível composto de 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 as especificações técnicas na Resolução N° 45 de 2014 da ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2014).

Este biocombustível tem origem renovável, é biodegradável, não tóxico além de representar uma potencial fonte de energia alternativa. O biodiesel pode ser utilizado como combustível ou aditivo de combustível e sua eficiente lubricidade e competitividade com o diesel de petróleo são propriedades importantes (WCO, 2007, KNOTHE, 2007).

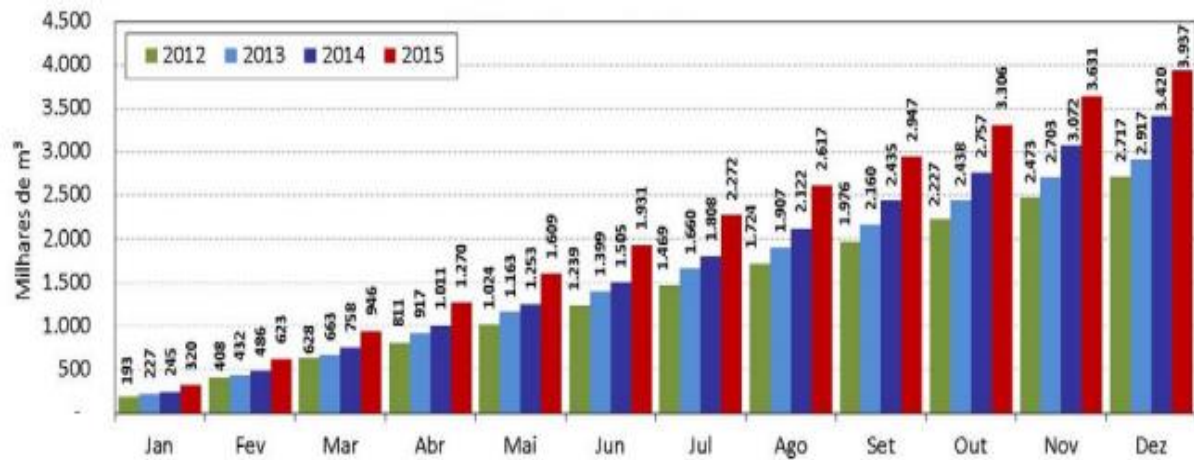
O emprego do biodiesel pode promover uma redução plausível das principais emissões de substâncias poluentes, como material particulado, hidrocarbonetos não queimados, monóxido de carbono e material particulado (CUNHA et al, 2009).

Os parâmetros padrões para avaliação da qualidade do biodiesel são pré-requisitos para o uso comercial de qualquer produto combustível. Desde a elaboração e aplicação da Norma Europeia de especificações, EN (Norma Europeia) 14214, em 2004, surgiu uma definição padronizada para o biodiesel metílico, como sendo, ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês, *Fatty Acid Methyl Ésters* (FAMES), produzido a partir de qualquer tipo de matéria-prima, incluindo óleos de fritura reciclados, em cumprimento das especificações de qualidade abordada (REFAAT, 2009)

A designação de biodiesel puro é representada por B100 (100% de ésteres alquílicos de ácidos graxos). No entanto, misturas de biodiesel e diesel de petróleo são utilizadas e a abreviação BX indica o volume em porcentagem de B100 na mistura com diesel. (MONTEIRO et al., 2008). Consequentemente, o B7, mistura com maior porcentagem v/v atualmente comercializada, é constituído por 7% de B100, e 93% de óleo diesel (MME, 2016).

De acordo com a ANP, a produção de biodiesel, em agosto de 2015, foi de 344 mil m³ e atingiu um acúmulo anual de 2.617 mil m³, um acréscimo de 23,3% em relação ao mesmo período de 2014 (2.122 mil m³). A Figura 4, apresenta a produção para os períodos de mistura B5 (até junho de 2014), B6 (julho até outubro de 2014) e B7(a partir de novembro de 2014) (MME, 2016).

Figura 4 - Produção de biodiesel anual acumulada desde a mistura B5.



Fonte: MME, 2016.

Através da avaliação da qualidade do biodiesel, seja a partir do teor de ésteres ou parâmetros físico-químicos, podem-se determinar informações bastante significativas sobre o mesmo, desde a escolha da matéria-prima até do comportamento do biodiesel como combustível e suas características de emissões (CRUZ, 2009).

Para avaliar as propriedades do biodiesel existem normas e legislações que apresentam métodos padronizados e adotadas por cada país. No Brasil, o biodiesel é fiscalizado pela ANP que, em 2014, estabeleceu a Resolução de N°45, na qual estão especificadas as exigências técnicas quanto ao teor mínimo de ésteres alquílicos e aspectos físico-químicos do biodiesel comercializado nacionalmente (RANP 45, 2013).

3.4 Metodologias para quantificação de ésteres alquílicos no biodiesel

As principais metodologias analíticas empregadas na análise de glicerídeos e ésteres alquílicos são: cromatografia em fase gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (WANG et al., 2011; MONTEIRO et al., 2008).

Na literatura, além da técnica de GC e HPLC alguns pesquisadores utilizaram outras técnicas para quantificar os ésteres alquílicos em amostras de biodiesel, tais como, a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em camada fina

(TLC) com detector FID, viscosidade cinemática, índice de acidez, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a ressonância magnética nuclear de H^1 (RMN H^1 e C^{13}) (MITTELBACH, 1996; ZAGONEL, 2004; CHONGKHONG, 2004; CHATTOPADHYAY, 2011, Carvalho, 2012).

3.5 Métodos de separação

Dentre todos estes métodos de análise citados, a cromatografia gasosa encontra-se em primeiro lugar no que diz respeito à separação e quantificação de compostos químicos os quais, no processo de separação são distribuídos entre duas fases: uma fixa e com ampla área superficial (Fase estacionária), e outra que é um fluido (Fase móvel) que percorre dentre toda a fase estacionária (LANÇAS, 1983; LANÇAS; 2009).

Em relação à fase móvel, a cromatografia pode ser líquida (fase móvel é um líquido), gasosa (fase móvel é um gás) e cromatografia com fluido supercrítico (fase móvel é um fluido supercrítico) (LANÇAS, 2009).

O procedimento padrão em GC envolve a análise da amostra de biodiesel utilizando uma coluna capilar a uma temperatura elevada e um detector de ionização em chama (FID). Para a técnica de HPLC a temperatura de análise é significativamente menor, porém, tem-se um elevado gasto de solventes com pureza analítica e requer bastante atenção para evitar bolhas nestes solventes. (CHATTOPADHYAY, 2011).

3.5.1 Cromatografia gasosa (GC)

Em GC utiliza-se fase móvel gasosa, conhecida como gás de arraste e um sistema volumétrico fechado, coluna cromatográfica, no qual está imobilizada a fase estacionária e pela qual o gás percorre. Em GC existem três tipos de fase estacionária: sólida, líquida ou fase ligada (LANÇAS, 1986).

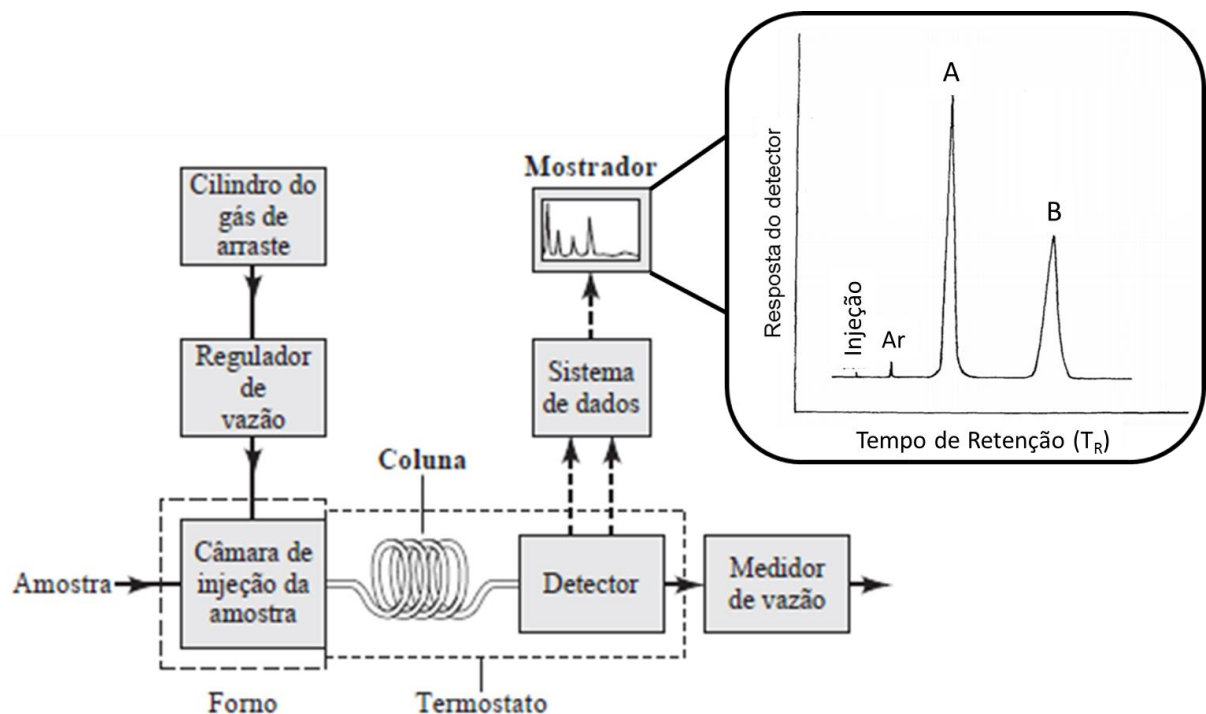
A fase estacionária apresenta certa resistência à passagem do gás, por isso, é necessário que o gás seja pressurizado em cilindros adequados. O gás ideal para GC deve ser puro, inerte e os mais utilizados são, nitrogênio, hélio ou hidrogênio (LANÇAS, 1986; SKOOG et al., 2006).

A separação cromatográfica depende da diferença de adsorção individual das espécies constituintes da amostra na fase estacionária (LANÇAS, 1983), isto é, o tempo de retenção dos compostos irá depender da interação de cada analito com a fase estacionária, de modo que o composto que interagir mais tempo com a fase estacionária, irá permanecer na coluna por mais tempo, assim será separado dos demais (LANÇAS, 1986).

O sistema de injeção da amostra é mantido a 50°C acima do ponto de ebulição da espécie química menos volátil presente na amostra. Algumas colunas cromatográficas limitam o volume de amostra para evitar alargamento dos picos e um divisor de fluxo (Split) é frequentemente utilizado para diluir a amostra. (LANÇAS, 1986; SKOOG et al., 2006).

Na figura 5 é demonstrado um sistema de blocos para os componentes de um aparelho de análise em cromatografia gasosa:

Figura 5 - Sistema de blocos de um cromatógrafo à gás.



Fonte: adaptado de LANÇAS (1983) e SKOOG, et al. (2006).

Nota: Em destaque tem-se a representação de um cromatograma da separação dos analitos A e B, obtido após análise e tratamento dos dados.

Após a separação cromatográfica que ocorre na coluna, os analitos são detectados individualmente por um detector seguindo a ordem crescente do tempo de eluição. O detector por ionização em chama (FID) é o mais utilizado (SKOOG et al., 2006). Por fim, os dados são registrados por um programa específico utilizado em computadores e demonstrados em uma espécie de gráfico, chamado de cromatograma, em destaque na Figura 5, que representa o sistema de blocos de um cromatógrafo.

3.5.1.1 Aplicação da cromatografia gasosa para a análise de biodiesel

Segundo Souza, 2013, a qualidade dos óleos e gorduras para a produção de biodiesel é determinada pela quantidade e qualidade dos ácidos graxos que constituem esta biomassa, por isso é importante conhecer, previamente, a composição de materiais graxos e de seus produtos formados. Souza e colaboradores separaram e quantificaram os ácidos graxos do óleo de coco de babaçu e óleo de pinhão manso.

Recentemente, estudos estão sendo realizados no Brasil com a utilização de GC para análise de biodiesel proveniente das mais variadas espécies de matéria-prima graxa e empregando diferentes ésteres como padrão interno (MARQUES et al., 2010; FARIA et al., 2007; SANTOS, 2013; SCHEUFELE et al., 2016).

Um exemplo atual, é a caracterização por GC de biodiesel etílico de macaúba, abundante em países tropicais como o Brasil, onde os tempos de retenção dos componentes das amostras na coluna foram comparados com padrões de ésteres e tricosanoato de metila (C23:0) empregado como padrão interno, uma vez que não foi identificado na amostra de ésteres produzidos a partir do óleo de macaúba (SCHEUFELE et al., 2016).

No caso de algumas matérias primas graxas mais complexas, como gordura animal, ou no caso de análise de misturas biodiesel-diesel é importante o desenvolvimento de métodos com algumas alterações, tais como, mudança na temperatura da coluna e a utilização de um padrão interno diferente ao C17:0 utilizado na EN 14103, porém, com características semelhantes e que não esteja presente no biodiesel (KNOTHE, 2006; MARQUES et al., 2010; SANTOS, 2013).

Schober et al., 2009, desenvolveram e testaram um método de GC – FID para a determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos poli-insaturados, isto é, com quatro ou mais ligações duplas, em biodiesel, baseando-se na separação cromatográfica numa coluna capilar altamente polar e 30 m de comprimento, sob variação de temperatura, usando o tricosanoato de metila (23:0) como padrão interno e uma razão de Split de 1/50 e tempo de análise de 29,33 min.

Ragonese et al., 2009, utilizaram uma coluna capilar com fase estacionária do tipo líquido- iônico e comprimento de 30 m, em GC - FID, para separar e quantificar ésteres metílicos de ácidos graxos em misturas biodiesel-diesel e determinaram que a alta polaridade da fase estacionária permitiu a separação dos FAMES e hidrocarbonetos descartando uma separação prévia destes compostos.

Marques et al., 2010, utilizaram um éster etílico, oleato de etila (C18:1), para a análise de biodiesel metílico de soja e compararam os resultados com o método EN 14103 para avaliar a exatidão do método. O uso de oleato de etila como padrão interno na caracterização do biodiesel apresentou resultados compatíveis aos determinados com a norma EN14103.

Santos e colaboradores, 2013, analisaram amostras de biodiesel metílico e etílico de soja por GC – FID seguindo a norma EN 14103 para o preparo da amostra porém, empregando laurato de metila ou etila (C12:0) como padrão interno e uma coluna apolar submetida à uma rampa de temperatura, gerando um tempo de análise de 29,33 min, limitando o método a amostras de biodiesel que não contenham o C12:0 em sua composição.

Canesin et al., 2014, separaram ésteres metílicos, produzidos a partir da transesterificação de óleos residuais, através de GC – FID equipado com coluna de sílica fundida e rampa de temperatura programada, usaram hidrogênio como gás de arraste, uma razão de split de 1/80 para injeção da amostra e a identificação dos ácidos graxos foi baseada nos tempos de retenção, comparados com padrões analíticos e padrão interno tricosanoato de metila (C23:0) e o tempo de análise foi de 28 min.

Tem-se empregado a técnica de GC para a análise de biodiesel e misturas de diesel e biodiesel, inclusive acoplando a técnica de GC à outras ferramentas ou até mesmo GC bidimensional abrangente com duas colunas cromatográficas conectadas sequencialmente (FARIA et al, 2007; CORTES, 2009; MORAES, 2011).

Seeley et al., 2007, aplicaram GCxGC com uma coluna convencional de 5% fenil polidimetilsiloxano e coluna secundária de polietileno glicol e observaram que, esta combinação gerou cromatogramas onde os ésteres metílicos dos ácidos graxos encontrados em biodiesel ocuparam a mesma região ocupada pelos numerosos alcanos cíclicos e mono- aromáticos encontrados no diesel de petróleo.

Tiyapongpattana, 2008, e colaboradores empregaram GC bidimensional para análise de misturas biodiesel-diesel e biodiesel de várias fontes, tais como óleo vegetal, gordura animal e óleos residual de cozinha, sendo o método capaz de diferenciar a origem do biodiesel e analisar ésteres alquílicos com números de carbono de C₄ a C₂₄.

Moraes et al., 2011, identificaram e quantificaram ésteres em amostras de biodiesel de sebo bovino e óleo de soja, de forma que, determinaram o percentual destes tipos de biodiesel em misturas biodiesel-diesel através de GCxGC – FID.

Além destes estudos com a técnica de GC na análise de ésteres alquílicos, outras aplicações desta técnica analítica tem sido desenvolvidas na análise do teor de álcool, glicerol livre, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos, e triacilglicerídeos de acordo com as respectivas normas e legislações (GAMA et al., 2010)

A cromatografia e a espectroscopia são as técnicas analíticas mais utilizadas em análises de biodiesel, sendo a cromatografia gasosa a técnica mais aplicada à caracterização de ésteres metílicos e etílicos devido a sua elevada precisão, para a quantificação de componentes menores (KNOTHE, 2006; MONTEIRO et al., 2008; SANTOS, 2013).

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 a

cromatografia gasosa com a espectrometria de massas e padrão interno propanoato de n-pentadecanoíla (C15:0).

3.5.1.2 Padronização interna em cromatografia gasosa

Para se obter maior precisão em metodologias quantitativas que envolvem GC, utiliza-se padrões internos afim de minimizar as incertezas geradas por injeção de amostra e variações instrumentais (SKOOG, et al., 2006; COLLINS et al., 2006).

Essa padronização interna é realizada através da adição de quantidade conhecida de padrão interno (PI) na amostra a ser analisada onde as duas áreas obtidas são relacionadas, de forma que, é construído um gráfico onde a razão de áreas (área do analito dividida pela área do padrão interno) é relacionada com a concentração da substância a ser quantificada. Por meio da análise da curva analítica construída com as áreas dos padrões externos divididas pela área do PI versus a concentração, determina-se a equação da reta que é aplicada à área do composto presente na amostra e com isso descobre-se a concentração do analito (SKOOG et al., 2006; COLLINS et al., 2006).

Com relação ao PI, a substância empregada deve ser estável, apresentar elevado grau de pureza, estrutura química semelhante à substância a ser quantificada, não estar presente na amostra, ter concentração e tempo de retenção próximos a substância de interesse porém, ficar separada das demais substâncias presentes na amostra (SKOOG et al., 2006; COLLINS et al., 2006; MARQUES et al., 2010).

No método da Norma Europeia (EN) 14103, indicado pela ANP e empregado no Brasil para quantificação de ésteres em biodiesel, utiliza-se o padrão interno C17:0 (éster heptadecanoato de metila), visto que, o mesmo encontra-se ausente no biodiesel oriundo da maioria dos tipos de materiais graxos empregados na produção de biodiesel. Porém, o ácido heptadecanoico está presente em algumas matérias-primas de origem animal, tais como, sebo bovino, gordura de peixe e banha de porco, seja este ácido livre ou ligado ao glicerol (NORMA EUROPEIA 14103).

Marques et al., 2010, desenvolveram uma metodologia empregando oleato de etila como padrão interno para determinação de ésteres do biodiesel metílico de soja. Estes pesquisadores avaliaram a exatidão do método através da comparação com o método EN14103 e verificaram que o uso de oleato de etila levou a resultados compatíveis com o fornecido pelo método EN14103.

3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Diferentemente da técnica de GC, onde é empregada uma coluna capilar, na técnica de HPLC, utiliza-se uma coluna empacotada e fase móvel líquida (eluente). O processo de separação em HPLC também é realizado por partição e adsorção, assim como em GC, mas também pode ser por troca iônica ou exclusão por tamanho. O maior fator que limita o uso desta técnica é o elevado custo de instrumentação e manutenção (LANÇAS, 2009).

A fase móvel pode ser um único solvente ou uma mistura de solventes com composição constante (eluição isocrática) ou, ainda, a fase móvel pode ser composta por um sistema de solventes com polaridades distintas que são eluídos de forma variada pré-programada durante a separação, algumas vezes de forma contínua e por vezes em etapas (eluição gradiente), (SKOOG et al., 2006).

A fase móvel é acondicionada em um frasco adequado e é impulsionada em direção à coluna com o auxílio de uma bomba de alta pressão. No percurso a amostra é introduzida na fase móvel, por uma válvula de injeção de amostra e arrastada para a coluna, onde ocorre a separação. Em seguida, o efluente da coluna é direcionado para um detector que aponta a presença dos compostos eluídos da coluna e gera o sinal captado por um software específico e um cromatograma, similar ao da GC, é gerado (LANÇAS, 2009).

Atualmente, a maioria das colunas cromatográficas são geralmente construídas de tubos de aço 316 inoxidável tratado, apresentam comprimento entre 10 a 30 cm e possuem diâmetros internos entre 2 e 5 mm. O tipo mais comum de suporte para fase estacionária em cromatografia líquida é constituída por partículas de sílica funcionalizada com C_{18} e formada por radicais apolares, alquil ou aril (LANÇAS, 2009; SKOOG et al., 2006)

O detector UV-VIS com comprimento de onda variável e arranjo de fotodiodos fornece informações estruturais importantes sobre os analito, porém são seletivos à compostos que absorvem nesta região do espectro. O detector de índice de refração por outro lado responde a todos os tipos de compostos porém, possui sensibilidade limitada. Além destes, a técnica dispõe de outros detectores por fotoionização, por condutividade, fluorescência, detector eletroquímico, dentre outros (1985; LANÇAS, 2009).

3.5.2.1 Aplicação da cromatografia líquida na análise de biodiesel

A cromatografia líquida é uma alternativa útil quando é necessária a determinação simultânea de ésteres alquílicos e acilglicerídeos não voláteis, que em GC necessitam ser derivatizados antes da análise (HOLCAPEK et al., 1999; NICOLA et al., 2008, Carvalho et al, 2012).

Segundo Holcapek e colaboradores, 1999, o método desenvolvido em HPLC com eluição gradiente de acetonitrila, água e uma mistura 2-propanol-hexano demonstrou melhor resolução na separação de mono-, di-, triacilglicerídeos individuais e ésteres metílicos, produzidos a partir do óleo de colza, quando comparado ao método com fase móvel metanol e 2-propanol-hexano, empregando diferentes tipos de detectores.

Nicola et al., 2008, desenvolveram uma metodologia para otimizar a resolução do método HPLC-UV que utiliza um gradiente de fase móvel binária e não aquosa (metanol e 2-propanol-hexano) e conseguiram uma maior eficiência e sensibilidade na separação dos componentes do biodiesel metílico do óleo de girassol.

Alguns estudos demonstraram que GC e HPLC apresentam resultados semelhantes. Carvalho et al, 2012, desenvolveram métodos baseados em HPLC-UV com excelente repetitividade, linearidade e sensibilidade, dos quais, um demonstrou resultados semelhantes ao método oficial da Sociedade Americana de oleoquímica (AOCS) que emprega GC- FID, em termos de quantificação de ésteres metílicos.

Em uma caracterização mais específica, Shang et al. (2012), utilizaram HPLC com detectores UV, a 210 nm, e IR acoplados para a análise de biodiesel de soja e conseguiram separar e determinar os compostos individuais, oleato de metila

(C18:1) e palmitato de metila (C16:0), principais ésteres metílicos e que geralmente apresentam picos sobrepostos.

3.6 Validação de Metodologias Analíticas

Desde a década de 70, o processo de validação tem sido alvo de estudos e tais instituições como a *Food and Drug Administration* (FDA) e *Environmental Protection Agency* (EPA), criaram o sistema denominado ISO/IEC-25 (*International Standardization Organization/ International Electrotechnical Commission*) para padronizar as normas a serem seguidas por laboratórios competentes na reprodutibilidade de serviços técnicos quanto variação em resultados de análises de técnicas analíticas entre diferentes laboratórios, (LANÇAS, 2004).

Na década de 80, foi divulgado que a definição dos parâmetros característicos e assuntos relacionados à validação de métodos não tinham o mesmo sentido entre as organizações existentes. Assim, em 1990, a Conferência Internacional sobre Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (*International Conference on Harmonization – ICH*) reuniu as autoridades reguladoras da Europa, Japão e Estados Unidos, com o objetivo de atingir maior harmonização dos parâmetros, condições e metodologias para validação de métodos analíticos (ARAUJO, 2009)

Desde então, em acordo com as normas do sistema ISO/IEC-25, cada país estabelece seu próprio programa de asseguarção da qualidade de serviços que os laboratórios regulamentados devem executar ao validar uma metodologia. Desta maneira, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que “a validação deve garantir, através 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).

Um processo de análise pode ser dividido nas seguintes etapas: desenvolvimento do método, otimização, validação e fases de aplicação. A validação demonstra, formalmente, que um sistema faz o que é submetido a fazer, reprodutivamente, com exatidão e precisão adequada (ERNI, 1987, BRUCE, 1998).

Alguns fatores que ocorrem no laboratório de procedimentos analíticos, como a variabilidade de amostra, contaminação, reagentes inadequados, erro de pipetagem, oscilação de temperatura, manutenção ou calibração irregular de equipamentos, analista inexperiente e perdas durante a análise, podem levar à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Por isso, faz-se necessário o processo de validação de um método (Lanças 2004).

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).

A terminologia e as definições utilizadas para descrever as diferentes propriedades do método durante a validação ainda variam sendo, geralmente, os estudos realizados para estabelecer critérios de desempenho analítico a fim de especificar um intervalo de concentração e tipo de matriz para a qual o desempenho do método é aceitável. Métodos analíticos são utilizados para diferentes pesquisas, desenvolvimento de produtos, controle de qualidade e processo, e cada uma das técnicas analíticas utilizadas individuais ou hifenadas, têm as suas características e falhas próprias, por isso, a validação de um método de análise depende do objetivo do método, técnica escolhida e o procedimento em questão (BRUCE, 1998).

Os principais critérios definidos pela ICH, e por outras agências industriais e regulamentadoras, tais como a ANVISA e o INMETRO aqui no Brasil, para validar técnicas e métodos analíticos de separação, são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação. Estas propriedades são conhecidas como, parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, as vezes, como figuras analíticas de mérito (THOMPSON, 2002; RIBANI et al., 2004; ARAGÃO, 2009; INMETRO, 2011).

3.7 Parâmetros de desempenho analítico para validação de métodos

3.7.1 Seletividade

A seletividade é o grau de separação e quantificação representado por um método ao determinar, com precisão, uma substância na presença de interferentes que podem estar presentes em uma amostra complexa, isso é, a avaliação da seletividade fornece valores de quantidades medidos para um ou mais analitos de tal modo que os valores de cada mensurado são independentes dos outros presentes na amostra ou substância a ser investigada. O sistema de um método seletivo tem a capacidade de medir a potência do sinal de um componente sem perturbação por sinais de outros componentes com propriedades similares, interferentes, impurezas, produtos de degradação e outros compostos (BOEF, 1983; IUPAC, 2002; RIBANI et al., 2004; IVM, 2012).

De acordo com Araujo (2009), as duas abordagens mais populares empregadas para determinar a seletividade são: comparação dos cromatogramas obtidos após injeção de amostras de branco sem e com os analitos; comparação da resposta cromatográfica obtida após injeção de soluções de análise com e sem todas as possíveis interferentes.

3.7.2 Linearidade e Faixa de trabalho

A linearidade é capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à diferentes concentrações do analito presente na amostra em um intervalo específico (faixa de trabalho) utilizado na construção da curva analítica. (WOOD, 1999; RIBANI et al., 2004).

Esta correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie química de interesse é avaliada a partir de sinais medidos para um intervalo de massas ou concentrações conhecidas do analito, expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, a partir da qual, são estimados, matematicamente, os valores dos coeficientes de regressão linear (a e b) da reta perpendicular à curva analítica e o coeficiente de correlação, r . Este último indica a qualidade da curva obtida, de modo que, quanto mais próximo de 1,0,

menor a dispersão dos pontos experimentais e maior a certeza e eficiência em determinar a coeficientes de regressão e correlação (RIBANI et al., 2004; MEIRA et al., 2015).

Em geral, a faixa de trabalho de um procedimento analítico pode ser definida como o intervalo entre a maior e a menor massa ou concentração do analito no qual se pode construir uma curva analítica linear com precisão e linearidade demonstradas, matematicamente, pela equação $y = ax + b$, a partir da qual pode-se calcular o intervalo da menor (limite de detecção) e maior quantidade (limite de quantificação) de analito onde o sinal pode ser relacionado com a concentração para a avaliação dos erros aleatórios e sistemáticos. Para demonstrar uma faixa linear aceitável, deve-se preparar no mínimo cinco soluções padrões (pontos experimentais) com concentrações diferentes (Araujo, 2009; RIBANI et al., 2004; LEITE, 2008).

3.7.3 Limite de detecção (LD)

Em termos gerais, o limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser detectada e distinguida com segurança a partir de zero, embora não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (RIBANI et al., 2004; MEIRA et al., 2015).

Existem três métodos de se calcular o LD: visual – utilização da matriz com adição de concentrações conhecidas da espécie de interesse, de modo que é possível distinguir ruído e sinal analítico através da menor concentração visível (detectável); relação sinal-ruído – comparação entre a resposta de um branco analítico e sinais obtidos com baixas concentrações do composto de interesse na amostra para estabelecer a concentração mínima na qual a substância pode ser detectada; e o método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção estimado no desenvolvimento de métodos, pode não ser idêntico ao conceito ou a um valor numérico usado para caracterizar um método analítico completo. Por exemplo, o "limite de detecção instrumental", como citado na literatura ou em folhetos de instrumento e, em seguida, ajustado para a diluição, é

frequentemente muito menor do que um limite de detecção "prático" e impróprio para validação do método (IUPAC, 2002; RIBANI et al., 2004; MEIRA et al., 2015).

O limite de detecção é expresso de acordo com a equação 01:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (01)$$

Onde, s é a estimativa do desvio padrão da resposta, da equação da linha de regressão; e S é a inclinação da curva analítica construída (RIBANI et al., 2004).

3.7.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitável sob as condições experimentais estabelecidas para um determinado procedimento experimental. Ela é determinada por meio da análise de soluções contendo concentrações diferentes do analito e decrescentes para o menor nível determinável (RIBANI et al., 2004; MEIRA et al., 2015).

E o limite de quantificação de acordo com a equação 02:

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (02)$$

3.7.5 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como o quociente entre a variação de um sinal de um sistema de medição e a correspondente alteração no valor de uma quantidade a ser medida, ou seja, esta propriedade infere como a resposta do método varia com a alteração da concentração da substância a analisar e é expressa pela inclinação da curva de calibração de modo que, em métodos sensíveis uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Dependendo das definições instrumentais, é um valor geralmente arbitrário que não é útil para validação, porém útil em processos de garantia da qualidade, no entanto, para testar se um instrumento está apto a executar um serviço padrão consistente e satisfatório (IUPAC, 2002; BRITO et al., 2003; VIM, 2012; MEIRA et al., 2015).

3.7.6 Precisão

A precisão pode ser avaliada pela repetitividade ou reprodutividade e representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob as mesmas condições, ou seja, precisão é 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 e em um curto intervalo de tempo (RIBANI et al., 2004; MEIRA et al., 2015).

A avaliação da precisão é um dos passos cruciais no processo de alcançar a repetitividade e reprodutividade durante a validação de uma técnica ou metodologia e este parâmetro expressa, numericamente, o erro aleatório ou o grau de dispersão de um conjunto de medições individuais, por meio do desvio padrão, variância ou do coeficiente de variação (desvio padrão relativo) (Araujo, 2009).

3.7.7 Robustez

A robustez afere a sensibilidade que a técnica ou metodologia apresenta quando submetida a pequenas variações. Um método cromatográfico é robusto quando não apresenta variações significativas nos dados fornecidos quando submetido a variações limitadas em parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. Estas mudanças introduzidas representam as variações que podem ocorrer quando um método é compartilhado entre laboratórios distintos, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).

Apesar de a avaliação da robustez não ser mencionada no relatório de conferências e não ser considerada na maioria das diretrizes de validação, esta propriedade 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).

3.7.8 Exatidão

Na maioria dos procedimentos experimentais analíticos, a questão mais importante é até que ponto o resultado obtido experimentalmente está em acordo com o valor aceito como verdadeiro para a quantidade ou concentração do analito que deseja-se medir. Este dado é expresso pela exatidão do método, a qual é definida pela Organização Internacional para Padronização (ISO) como o grau de concordância entre um resultado do método em teste e o valor de referência aceito como verdadeiro (MILLER, 2010).

A exatidão depende da precisão e da veracidade do método, mas há outros fatores que influenciam a variabilidade geral dos resultados de uma medição, tais como a habilidade do operador. Os principais métodos para o estudo da exatidão baseiam-se na utilização de material de referência certificada, ensaios de recuperação ou comparação do método proposto com um método de referência (FEINBER, 2007; MEIRA et al., 2015)

A exatidão quando avaliada através de ensaios de adição e recuperação, é estabelecida com um mínimo de nove determinações que envolvem um mínimo de três níveis de concentração diferentes. Por exemplo, em ensaios em triplicada para três níveis de concentração (ABREU, 2008; MEIRA et al., 2015)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Na tabela 2, estão apresentados os reagentes utilizados neste na produção de biodiesel e no preparo das amostras para análise em GC, HPLC e RMN H¹.

Tabela 2 - Reagentes empregados na produção de biodiesel e no preparo das amostras para.

| Reagentes | Pureza | Fornecedor |
|--|-----------------------|-------------------|
| Álcool metílico | > 99,5 % Grau HPLC | Dinâmica TEDIA |
| Álcool etílico | > 99,5 % | Dinâmica |
| Álcool Isopropílico (2-propanol) | > 99,5 % Grau HPLC | Dinâmica TEDIA |
| Hexano | > 98,5 % Grau HPLC | Dinâmica TEDIA |
| 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 |
| Trioctanoato de glicerila (Tricaprilina) | > 99,0 % | Sigma |
| Heptadecanoato de metila | > 99,0 % | Sigma |
| Clorofórmio deuterado | ≥ 99,8% | Sigma |

Fonte: Autor, 2016.

4.2 Produção e caracterização das amostras padrão de biodiesel de soja

Foram produzidas amostras de biodiesel metílico e etílico padrão, B100, com 100% de conversão de triacilglicerídeos em ésteres alquílicos utilizando as melhores condições reacionais: proporção 01:06:0,2 (óleo:álcool:catalisador); temperatura constante de 60°C e 70 °C para reações com metanol e etanol, respectivamente, e hidróxido de sódio foi empregado como catalisador (MENEGHETTI et al., 2015b).

As reações de transesterificação foram conduzidas em um sistema fechado, Figura 6, constituído por um balão de 150 mL acoplado ao condensador com aparelho de refrigeração, sob agitação magnética (aproximadamente 100 rpm) e aquecimento em banho de óleo, sendo, a temperatura constante (70 °C para reações com metanol e 60° C para reações com etanol) e monitorada por um termopar. As massas dos reagentes foram medidas em uma balança analítica modelo AX200, Shimadzu (Quioto, Japão).

Ao término das reações, as amostras foram depositadas em funis de decantação para a separação dos produtos reacionais: biodiesel e glicerol. Em seguida o biodiesel foi neutralizado com solução aquosa de ácido fosfórico 5% (v/v) e, por fim, lavado com salmoura (Solução de NaCl) até obter um biodiesel com pH, de cerca de 7,0.

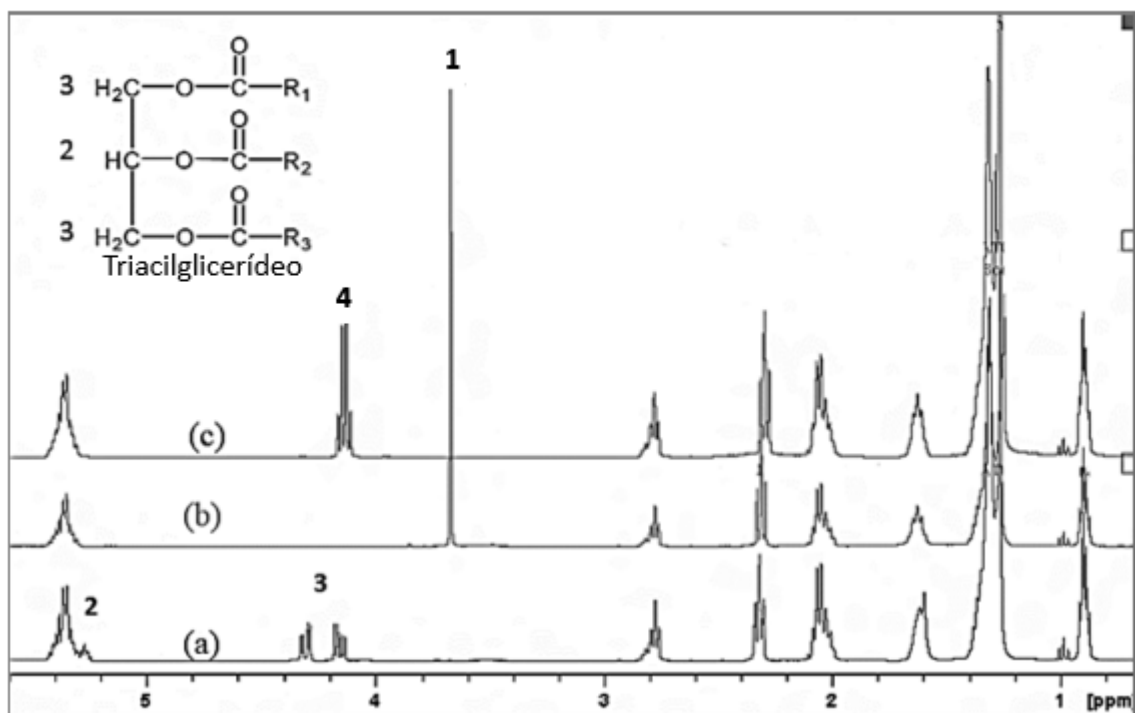
Figura 6 - Sistema reacional empregado nas reações de transesterificação.



Fonte: Autor, 2016.

A conversão total, de triacilglicerídeos em ésteres alquílicos, foi monitorada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1) conforme apresentado na Figura 7. No preparo da amostra foi pesada uma massa igual à 0,2 g de biodiesel a qual foi dissolvida em 0,5 mL de clorofórmio deuterado. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados no espectrômetro Bruker DRX-400 (Billerica, EUA).

Figura 7- Espectros de RMN H^1 para monitoramento da reação de transesterificação do óleo de soja.



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

Nota: Espectros: (a) óleo de soja refinado; (b) biodiesel metílico de soja; (c) biodiesel etílico de soja em clorofórmio deuterado; 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).

Analisando os espectros na Figura 7, observa-se que, os sinais (2 e 3) referentes aos triacilglicerídeos são obtidos na análise do óleo de soja, porém, os mesmos sinais desaparecem após a reação de transesterificação do óleo de soja e, o sinal 1, referente aos ésteres metílicos (3,6 ppm), e um sinal 4, referente aos ésteres etílicos (4,1 - 4,35 ppm) passam a existir nos espectros obtidos com as

análises dos respectivos tipos de biodiesel (MENDONÇA, 2008; MENEGHETTI et al., 2015a).

Dessa forma, a técnica de RMN H^1 foi empregada foi aplicada ao monitoramento da conversão dos triacilglicerídeos constituintes de todos os materiais graxos empregados na produção de biodiesel neste estudo.

4.3 Produção de amostras de biodiesel metílico e etílico de soja com diferentes concentrações de ésteres alquílicos

Em seguida 40 amostras de biodiesel de soja (20 amostras de biodiesel metílico e 20 amostras de biodiesel etílico) foram produzidas a partir da transesterificação alcalina do óleo de soja empregando Hidróxido de Sódio (NaOH) como catalisador e variando as proporções molares dos reagentes, tempo reacional e temperatura, para obter uma ampla faixa de conversão de triacilglicerídeos em ésteres alquílicos correspondentes.

As reações foram realizadas utilizando o mesmo sistema reacional apresentado na Figura 6 (Seção 4.1), de forma que, a proporção molar (óleo:álcool:catalisador) e as condições reacionais (temperatura e agitação) utilizadas para a produção das amostras de biodiesel de soja foram variadas afim de se obter uma ampla faixa de conversão de triacilglicerídeos em ésteres alquílicos.

4.4 Metodologia de coluna curta utilizado no laboratório do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR)

Para a quantificação de ésteres metílicos de soja, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (GC), empregando-se 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 μ L 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 μ m 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; aquecimento de 180 °C até 230 °C, a

uma taxa de 7 °C/min; aquecimento de 230 °C até 340 °C, a uma taxa de 30 °C/min. 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 rendimento em ésteres alquílicos (R%) foi calculado pela equação 03:

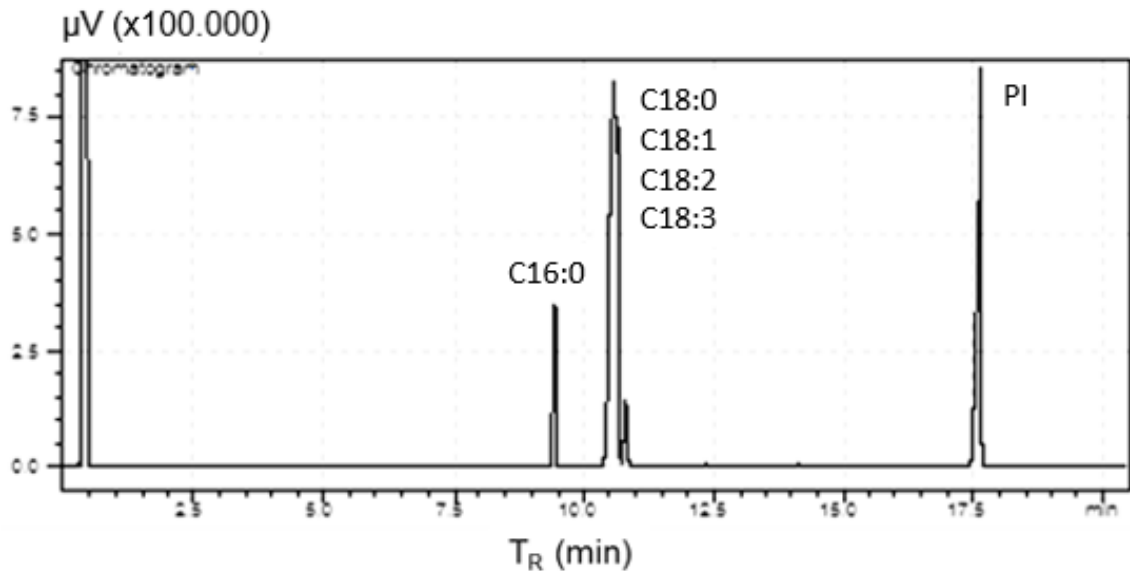
$$\%R = \frac{m_{PI} \times A_S \times F}{A_{PI} \times m_s} \times 100 \quad (03)$$

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.

O diferencial deste método é o uso do fator resposta (F) que foi determinado em cada dia de análise utilizando um padrão de biodiesel de cada matéria-prima. Tendo a certeza de que as amostras de B100 apresentaram 100% de conversão de triacilglicerídeos em ésteres alquílicos, este fator foi determinado e utilizado como fator de correção para estimar os rendimentos em ésteres das demais amostras de biodiesel, de forma que, o fator utilizado para cada tipo de matéria-prima, foi o determinado com o respectivo tipo de biodiesel.

A Figura 8 representa o cromatograma de uma amostra de biodiesel de soja empregado como padrão em cromatografia gasosa no método GC-coluna curta.

Figura 8 - Cromatograma do biodiesel padrão de soja. C16 e C18: Mistura de ésteres metílicos contendo 16 carbonos e 18 carbonos, respectivamente; PI: Padrão interno Tricaprilina.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: T_R é Tempo de retenção; Ésteres de ácido: C16:0 - ácido palmítico; C18:0 - esteárico; C18:1 - oleico; C18:2 - linolêico; C18:3 - linolênico; PI - padrão interno tricaprilina.

4.5 Validação da metodologia de coluna curta utilizada no GCaR

Todos os parâmetros de desempenho analítico avaliados para a validação do método em uso, foram determinados a partir de análises cromatográficas das amostras de biodiesel metílico de soja.

A metodologia foi validada com relação aos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (comparação de métodos e ensaio de recuperação, com base nas indicações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e de algumas publicações (RIBANI et al., 2004; VIEIRA et al., 2007; ABREU et al., 2008; INMETRO, 2011).

4.5.1 Seletividade

A seletividade do método em estudo, foi estudada por meio da análise de amostras do óleo de soja utilizado na fabricação do biodiesel metílico e um mistura,

óleo de soja:biodiesel padrão com 100% de conversão, (50:50 m/m). Os cromatogramas foram comparados para verificar a capacidade do método em separar, identificar e quantificar os analitos na presença de interferentes e impurezas presentes na matéria-prima.

4.5.2 Linearidade e faixa de trabalho

Foi empregado o método de padronização interna para a construção da curva analítica. A curva analítica foi construída utilizando uma faixa de trabalho de 0,03 g/mL à 0,17 g/mL de amostra de biodiesel metílico de soja, num total de 5 pontos experimentais.

O gráfico da curva analítica foi construído plotando a razão, área da substância/área do padrão interno (com concentração constante) versus a concentração do analito em g/mL. As análises para construção da curva analítica foram realizadas em triplicata. Foi determinado o coeficiente de correlação, r , para avaliar a linearidade do método e qualidade das curvas obtidas.

Com base nestas curvas analíticas ainda foi possível avaliar outros parâmetros de desempenho: sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação.

4.5.3 Limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada no método dos parâmetros da curva analítica calculados com o auxílio do programa de tratamento de dados gráficos e estatísticos Microcal Origin[®], versão 6, sendo:

O limite de detecção expresso pela equação 01:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (01)$$

E o limite de quantificação expresso pela equação 02:

$$LD = 10 \frac{s}{S} \quad (02)$$

Onde, para ambas as equações descritas acima, s é a estimativa do desvio padrão da resposta obtida com a menor concentração utilizada na construção da curva analítica, da equação da linha de regressão; e S é a inclinação da curva analítica construída (RIBANI et al., 2004).

4.5.4 Sensibilidade

A partir da determinação e avaliação do comportamento do coeficiente angular da curva analítica construída, foi possível avaliar a sensibilidade do método da coluna curta. A sensibilidade também foi avaliada através do estudo da robustez do método.

4.5.5 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. Repetitividade (intra-ensaio) – foram realizadas 10 medições da mesma amostra de biodiesel metílico de soja, sendo esta, preparada 10 vezes para injeção. A repetitividade foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD – *Relative Standard Deviation*);
- II. Precisão intermediária - uma única amostra de biodiesel (diferente da amostra empregada na repetitividade) foi analisada e preparada 10 vezes por outro analista diferente em um dia diferente do estudo da repetitividade.

Em ambos os métodos citados acima, foram estimados os desvios padrões e calculado o coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD), calculado a partir da segunda equação 04:

$$RSD = \frac{s}{CMD} \times 100 \quad (04)$$

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.

De acordo com GOMES, 1990, o desvio padrão relativo indica a precisão de um procedimento experimental e é classificado como baixo (quando inferior a 10%), médios (de 10 a 20%), alto (valores de 20 a 30%) e muito altos (para valores superiores a 30%).

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).

4.5.6 Robustez

O teste de robustez foi realizado para verificar a sensibilidade e estabilidade dos dados fornecidos pelo método de coluna curta ao sofrer duas variações nas condições de preparo da amostra:

- I. Troca do solvente: o hexano, solvente utilizado no procedimento de preparo da amostra para a análise cromatográfica, foi alternado por uma mistura 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. Adição de Cloreto de Sódio (NaCl) à amostra para mudar a força iônica da solução.

4.5.7 Exatidão

4.5.7.1 Comparação de metodologias

Foi avaliado o fator de correlação, r , entre resultados obtidos com o método de coluna curta e com os dois métodos de referência, EN 14103 (método 01) (ANP, 2014; EN 14103, 2001) e HPLC-UV (método 02) (Carvalho, 2012), descritos abaixo, e foi verificado o nível de proximidade entre estes valores.

4.5.7.1.1 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 alquílicos no biodiesel, foi empregado para uma análise comparativa dos resultados obtidos com a metodologia de coluna curta.

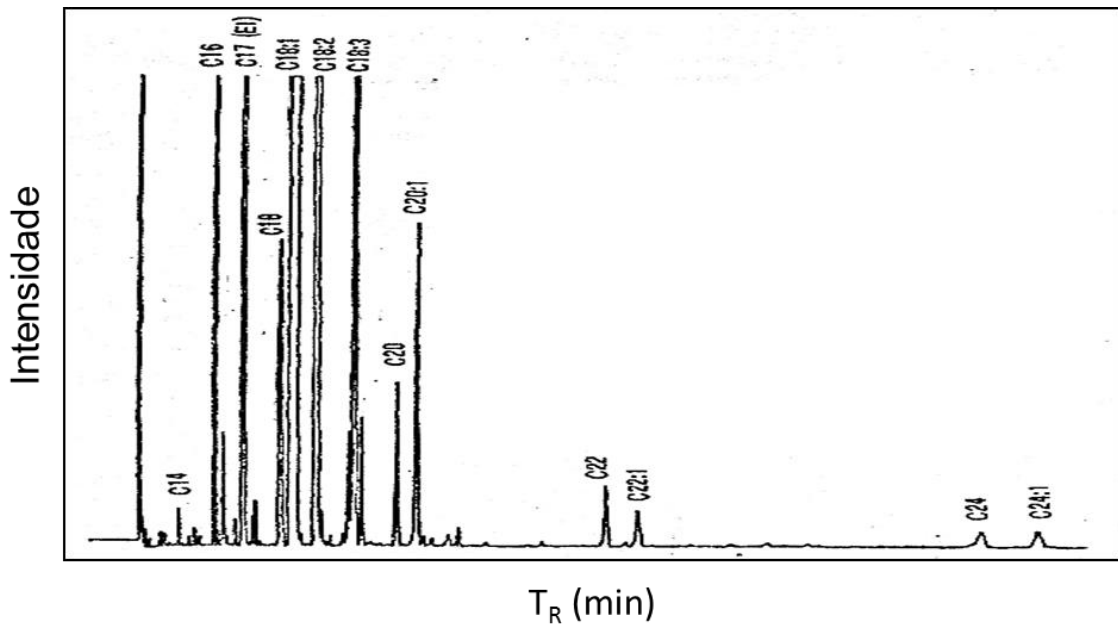
Nesta metodologia, foi dissolvido, aproximadamente, 0,0500 g da amostra de biodiesel em 1,0 mL da solução de heptadecanoato de metila (C17:0) em heptano de grau analítico (0,01 g/mL). Foi empregando um instrumento GC-2010/Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com um sistema de injeção split/spliteless operando 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 30.0 m de comprimento, 0,32 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 temperatura do forno e coluna foi constante de 250°C por 25 min; A composição em ésteres alquílicos foi calculada a partir da equação 05:

$$C = \frac{(\sum A_B) - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{M_B} \times 100 \quad (05)$$

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, 2001; RANP 45, 2014).

A Figura 9 representa um exemplo de cromatograma obtido pela análise de biodiesel metílico de colza empregando a metodologia EN 14103.

Figura 9 - Cromatograma referente a análise de uma mistura ésteres metílicos do biodiesel de colza por GC EN 14103.



Fonte: Adaptado de Norma Europeia 14103, 2001.

Nota: Ésteres de ácido graxo: C14 - mirístico; C16 - palmítico; C17 (Padrão interno) - margárico; C18 - esteárico; C18:1 - oleico, C18:2 - linoléico, C18:3 - linolênico, C20 - araquídico; C20:1 - kicozenóico; C22:0 - berénico; C22:1 - docosenóico; C24 - lignocérico; C24:1 - tetracosenóico; T_R é o Tempo de retenção.

4.5.7.1.2 Método de referência 02: Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC-UV

O outro método de referência empregado para o estudo comparativo dos resultados obtidos com o método de coluna curta, foi o método de HPLC-UV elaborado na Universidade de Brasília e que também é utilizado no laboratório para a determinação simultânea de ésteres metílicos de ácidos graxos, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e triacilglicerídeos (Carvalho, 2012).

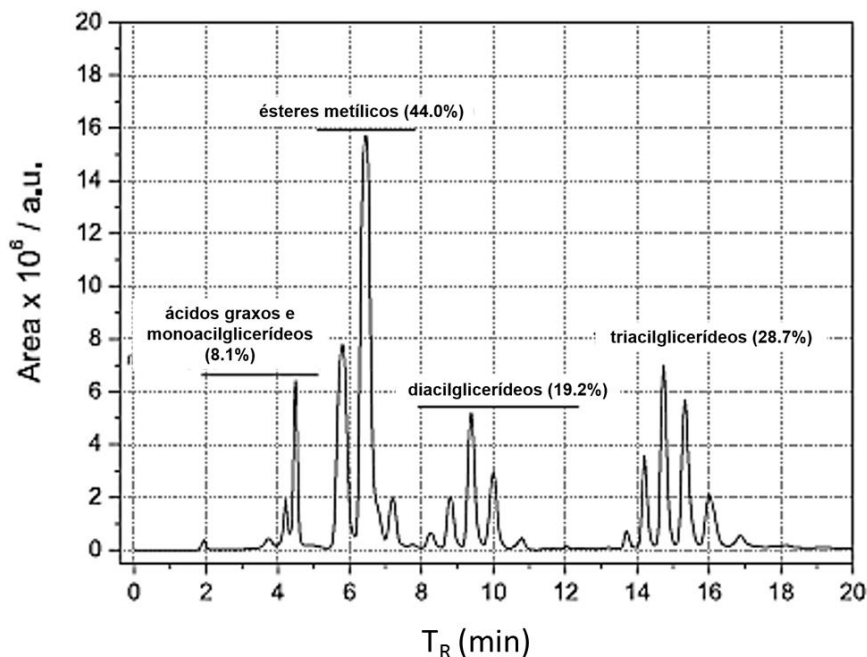
As análises foram realizadas em um equipamento de HPLC da marca VARIAN (Toronto, EUA) com detector UV-Vis violeta ajustado na faixa de 205 nm. Foi empregada uma coluna de fase reversa individual Shim-pack ODS-VP C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 mm) mantida a temperatura constante de 40 °C. O volume de injeção foi de 10 μ L e a taxa de fluxo de 1 mL/ min. O tempo total de análise foi de

20 min onde foi usado um gradiente de metanol (MeOH) e uma solução de 2-propanol-hexano (PrHex) 5:4 (v/v), sendo, 100% de MeOH em 0 min, 50% de MeOH e 50% de PrHex em 10 min mantido com eluição isocrática por 10 min.

Para preparar as amostras para análise no método de HPLC-UV, foram dissolvidos 25 μ L de biodiesel em 2 mL do solvente 2-propanol com grau de pureza HPLC.

A Figura 10 representa um cromatograma obtido pela análise de biodiesel metílico de soja empregando a metodologia HPLC-UV.

Figura 10 - Cromatograma referente a análise de uma amostra de ésteres metílicos do biodiesel de soja por HPLC-UV.



Fonte: Adaptado de CARVALHO, 2011; HOLCAPEK et al., 1999.

4.4.7.2 Ensaio de recuperação

Para este teste foi selecionada uma amostra a qual foi denominada como referência. Esta amostra foi fortificada com B100 de soja em três níveis de concentração, cada um analisado em triplicata e a recuperação avaliada segundo o INMETRO, calculada da seguinte maneira:

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

(06)

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 RINANI et al, 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 $\pm 15\%$.

4.6 Aplicação da metodologia de coluna curta para a análise de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas

Na segunda etapa do projeto, foram realizadas reações de transesterificação alcalina com álcool metílico e diferentes tipos de matérias primas: algodão, canola, coco, dendê, gergelim, girassol, gordura de frango, mamona e milho. Foram realizadas 4 reações com cada tipo de óleo ou gordura, sendo uma das reações para obter o padrão de biodiesel dos respectivos óleos, utilizado no cálculo do fator resposta para cada tipo de biodiesel. Por sua vez, estas amostras de biodiesel foram empregadas no estudo comparativo da resposta dos ésteres metílicos, produzidos a partir de diferentes matérias-primas, com a metodologia de cromatografia com coluna curta e a metodologia da norma europeia.

Para as reações de transesterificação, foram utilizados óleos comerciais encontrados em supermercados, com exceção do óleo de mamona, óleo de gergelim e gordura de frango, estes dois últimos fornecidos pelo Laboratório de Sistemas de Separação e Otimização de Processos (LASSOP/UFAL).

A gordura de frango foi obtida em parceria com o LASSOP da seguinte maneira: 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.

As reações de transesterificação foram realizadas variando as proporções molares e condições reacionais, assim como efetuado na transesterificação do óleo de soja na primeira parte do trabalho, variando a quantidade de álcool metílico (de 1 a 6 mols), a quantidade de catalisador hidróxido de sódio (de 0,1 a 0,2 mols), temperatura (60 – 70 °C) e tempo reacional (de 5 a 60 min).

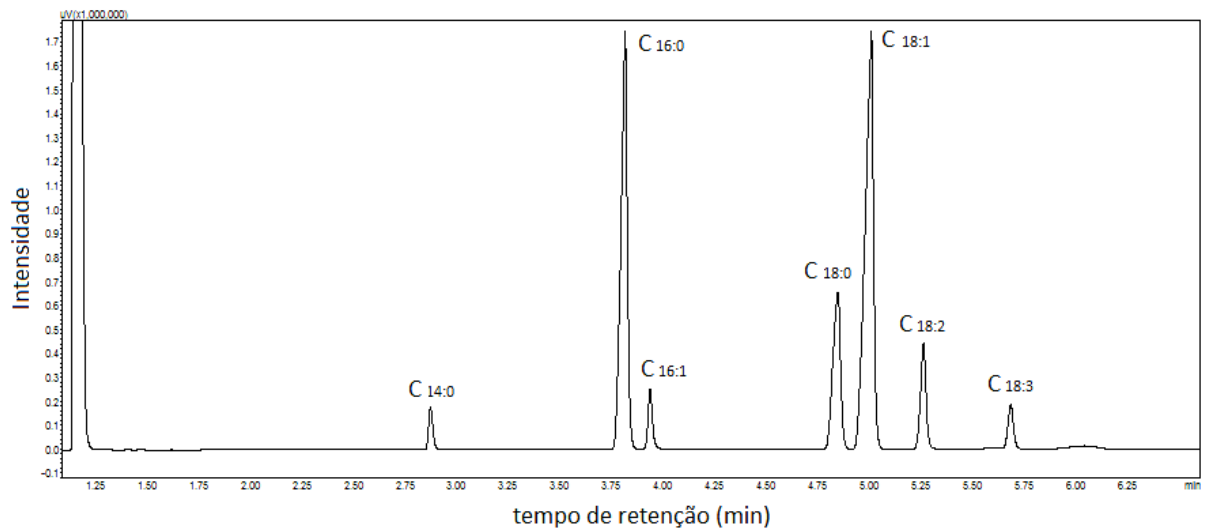
4.6.1 Caracterização do óleos e gorduras utilizados como matéria-prima

Durante o desenvolvimento do projeto foi necessário caracterizar as matérias primas em termos de composição em ácidos graxos para determinar a massa molar de triacilglicerídeos de cada matéria-prima e calcular a razão molar dos reagentes, óleo/gordura:álcool:catalisador, utilizados nas reações de transesterificação para obter amostras com diferentes concentrações em ésteres alquílicos.

Para a identificação dos ácidos graxos da gordura de frango, a mesma foi transesterificada com NaOH para a formação dos ésteres metílicos. Estas amostras de ésteres metílicos foram analisadas por cromatografia gasosa (GC), através de uma adaptação do método prescrito pela norma europeia EN 14103, onde dissolve-se, aproximadamente, 0,0500 g em da amostra em 1,0 mL de heptano. Foi empregado um instrumento 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 filme com 0,25 µm de espessura 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), 225 – 245 °C (3 °C/min), de modo que, o tempo total de análise foi de 11 min. A composição em ácidos graxos foi calculada com base na identificação dos ácidos graxos por comparação dos tempos de retenção com duas misturas padrões de ésteres, mistura C14:0-C18:3 (2%-C14, 30%-C16, 3%-C16:1, 14%-C18, 41%-C18:1, 7%-C18:2, 3%C18:3) e mistura C16:0-C20:0 (6%-C16, 3%-C18, 35%-C18:1,

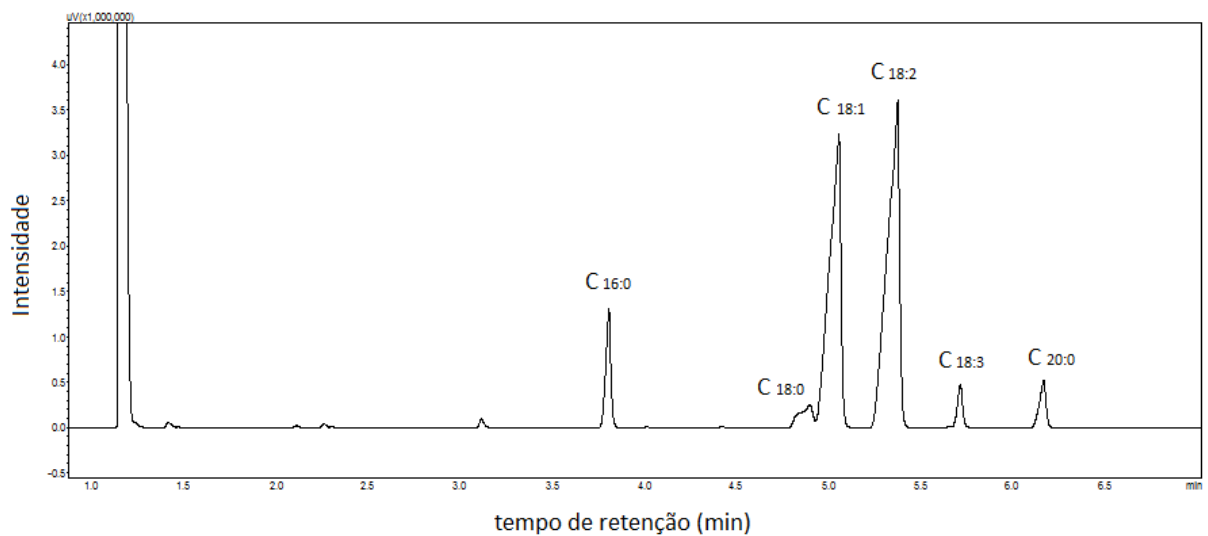
50%C18:2, 3%-C18:3, 3%-C20:0), Figuras 11 e 12, respectivamente. Foi realizada a integração das áreas dos picos por normalização para quantificar estes ácidos graxos.

Figura 11 - Cromatograma obtido com a análise de uma mistura de padrões C14:0-C18:3.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 12- Cromatograma obtido com a análise de uma mistura de padrões C16:0-C20:0.



Fonte: Autor, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método de cromatografia gasosa com coluna curta

Como descrito no capítulo 4, a validação da metodologia analítica baseada em cromatografia gasosa de coluna curta em uso no GCaR foi realizada utilizando-se as 20 amostras de biodiesel metílico de soja e 20 amostras de biodiesel etílico de soja.

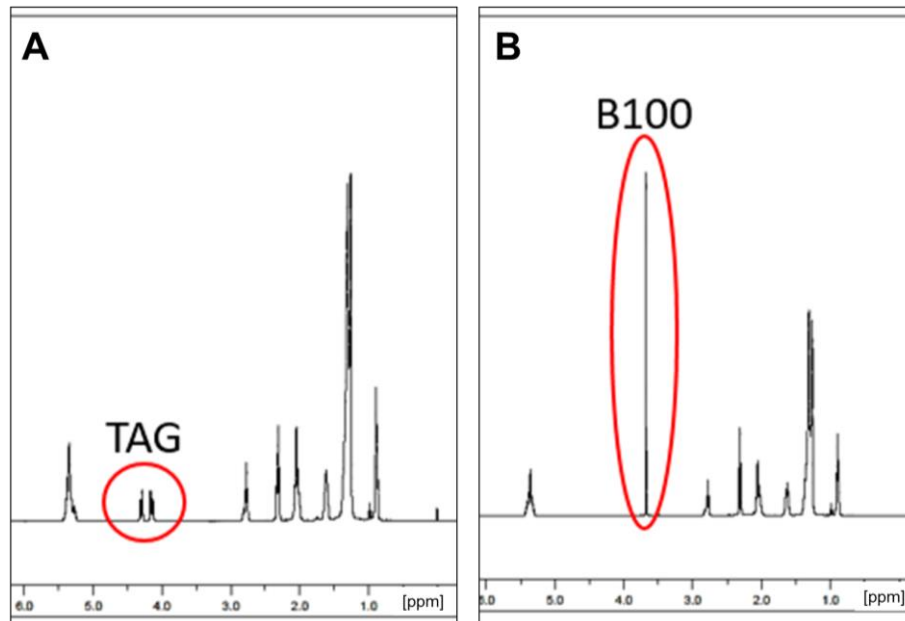
Inicialmente foram preparados os padrões de biodiesel metílico e etílico de soja para o cálculo dos fatores resposta. A caracterização destes padrões e a validação da metodologia está apresentada a seguir.

5.1.1 Caracterização dos padrões de biodiesel por RMN H^1

A caracterização dos padrões de biodiesel foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de H^1 . Na Figura 13 estão apresentados os espectros de RMN H^1 obtidos para o óleo de soja e o biodiesel metílico padrão de óleo de soja, respectivamente.

Através da análise dos espectros na Figura 13, é possível identificar a total conversão dos triacilglicerídeos, presentes no óleo de coco, em ésteres metílicos, visto que, não se observa a presença dos sinais referentes aos prótons glicerídicos (TAG – 4,1 - 4,35ppm) e ocorreu o surgimento do pico do B100 de coco no deslocamento de aproximadamente 3,6 ppm.

Figura 13 - Espectros de RMN H¹ obtidos para o óleo de soja e para o biodiesel de soja metílico.



Fonte: Autor, 2016.

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

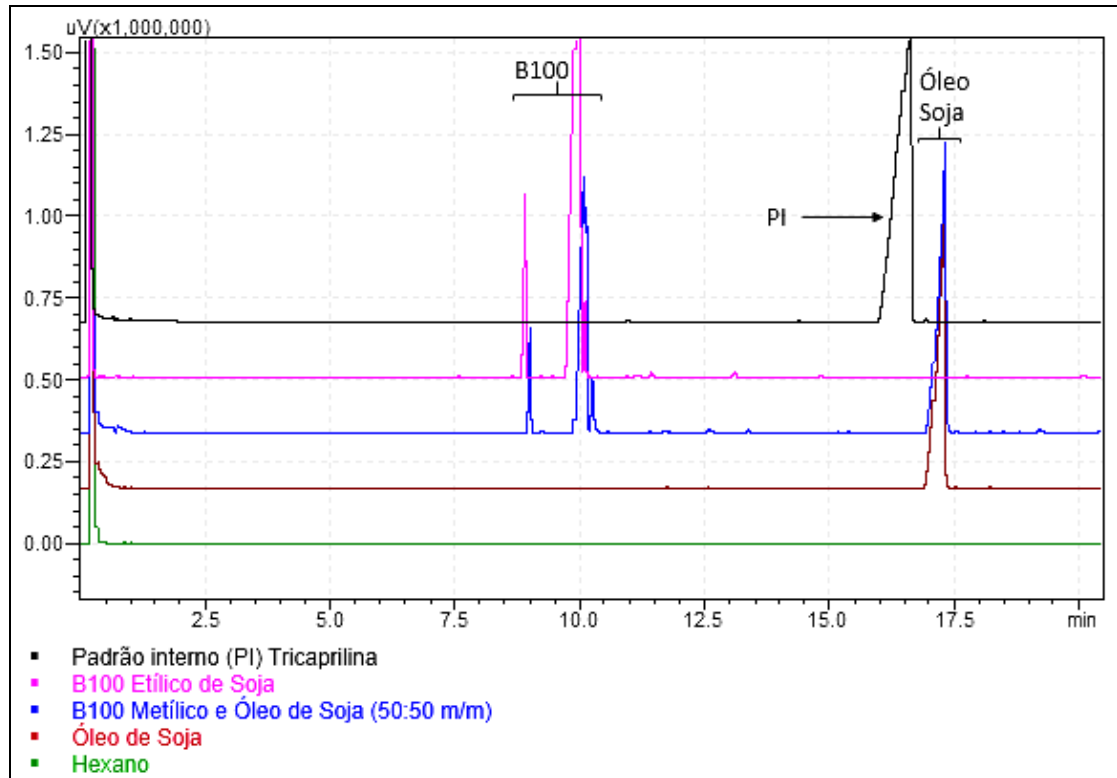
5.1.2 Caracterização dos padrões de biodiesel por cromatografia gasosa com coluna curta

A Figura 8 (Seção 4.3) representa o cromatograma de uma amostra de biodiesel metílico de soja, o qual foi empregado como padrão e determinação do fator resposta utilizado na quantificação de ésteres metílicos do óleo de soja através da metodologia GC-coluna curta por integração e normalização das áreas dos picos cromatográficos conforme descrito na seção 4.3. O mesmo procedimento foi efetuado para os demais tipos de biodiesel produzidos durante este trabalho.

5.1.3 Seletividade

Na Figura 14 estão apresentados os seguintes cromatogramas: padrão interno tricaprilina, hexano (solvente utilizado no preparo da amostra), óleo de soja, mistura B100:óleo de soja (50:50 m/m), B100 de soja etílico, todos realizados no método de coluna curta, utilizado no GCaR.

Figura 14 - Comparação dos cromatograma obtidos com as injeções padrão interno tricaprilina, hexano (solvente utilizado no preparo da amostra), óleo de soja, mistura B100:óleo de soja, B100 de soja etílico no método de cromatográfica gasosa com coluna curta.



Fonte: Autor, 2016.

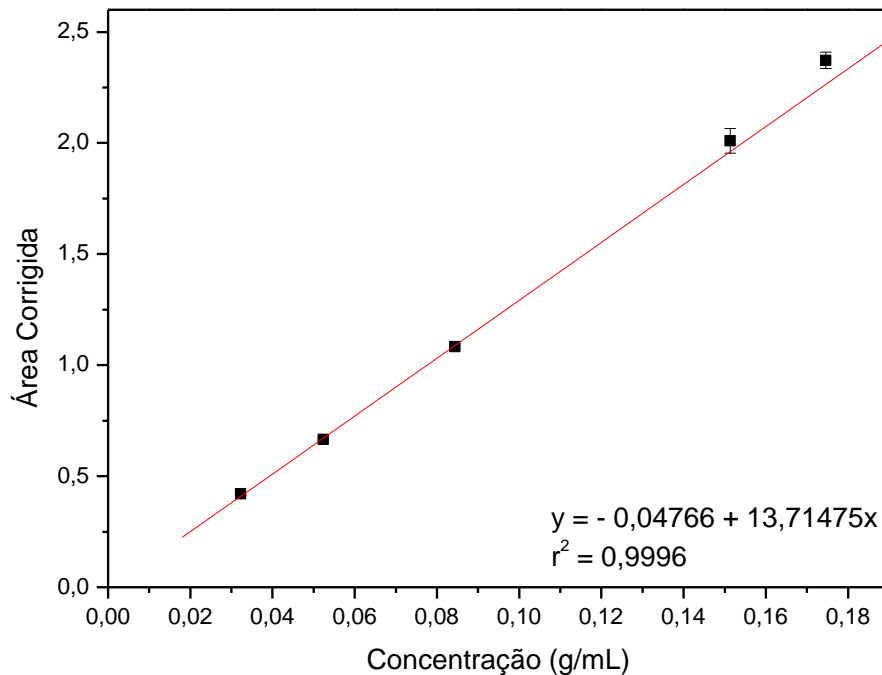
Embora a metodologia de coluna curta não separe os ésteres entre si, isto é, em número de carbono e de insaturações, o método é seletivo na separação de ésteres alquílicos totais dos demais componentes presentes na amostra, como triacilglicerídeos que não reagiram durante a reação.

5.1.4 Linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

Os parâmetros linearidade e faixa de trabalho, foram avaliados a partir da curva analítica construída com análise em triplicata de um biodiesel padrão de soja numa faixa de concentração com cinco pontos experimentais (0,0323 – 0,0524 – 0,0844 – 0,1513 – 0,1746 g/mL) e 0,08 g/mL de tricaprilina. Para a construção da

curva foi utilizada as áreas corrigidas, isto é, a razão entre as áreas do biodiesel e do padrão interno tricaprilina versus a concentração da amostra (Figura 15).

Figura 15 - Curva analítica obtidas com 5 pontos experimentais de uma amostra padrão de biodiesel do óleo de soja.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: No gráfico estão apresentadas as barras de erro calculado para cada análise em duplicata.

Para a curva analítica construída, os limites de detecção e quantificação obtidos, encontram-se idealmente dentro de suas respectivas faixas de trabalho. Considerando o desvio padrão da resposta obtido, $SD = 0,02802$, e a inclinação da curva analítica construída, $S = 13,71475$, e de acordo com as equações 01 e 02:

$$LD = 3,3 \frac{S}{S} \quad (01)$$

$$LQ = 10 \frac{S}{S} \quad (02)$$

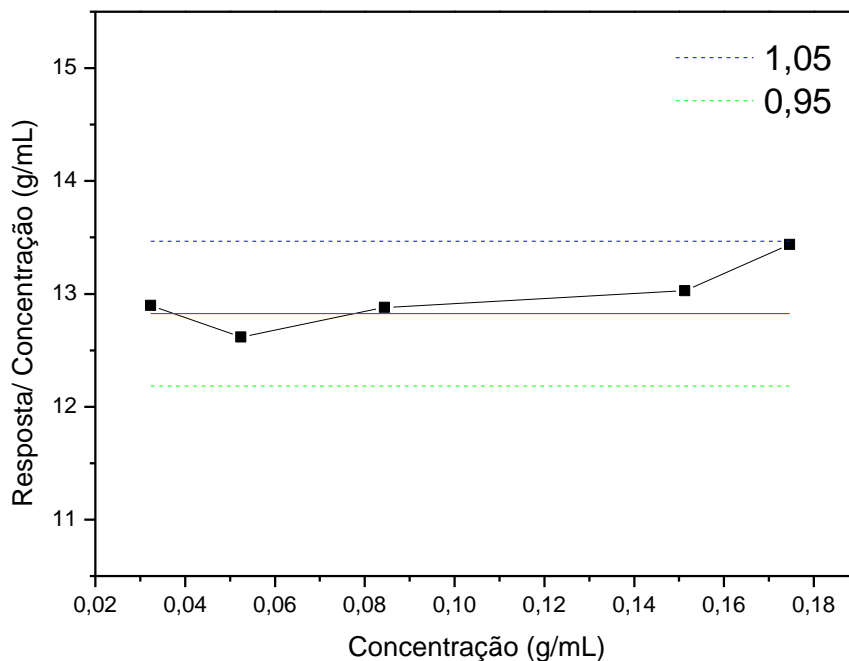
O método de coluna curta apresentou um limite de detecção de aproximadamente $0,0067 \text{ g/mL}$, que representa o menor valor detectado em confiabilidade de precisão aceitável, em termos de concentração, de ésteres

metálicos presentes em amostras de biodiesel de soja. Quanto ao limite de quantificação, o menor valor quantificado foi igual à 0,0204 g/mL.

Observou-se uma excelente linearidade da curva, através do coeficiente de correlação obtido, $r = 0,9996$.

De acordo com Ribani et al. (2004), foi construído outro gráfico para demonstrar se os pontos da curva analítica construída obedecem a faixa linear, de forma que, os sinais obtidos com o método foram divididos pelas respectivas concentrações, fornecendo as respostas correspondentes (eixo y) e, as concentrações relativas foram expressas no eixo x, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 - Determinação gráfica da curva de linearidade através do gráfico da razão sinal/concentração versus concentração.



Fonte: Autor, 2016.

Foi obtida então a linha horizontal (Mediana) sobre a faixa linear e inseridas mais duas linhas paralelas à mediana no gráfico, para 95 e 105% da linha da faixa linear onde foi possível observar que o método demonstrou ser linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 105%.

5.1.5 Precisão

A precisão da metodologia GC-coluna curta foi avaliada através do estudo precisão intra-ensaio e precisão intermediária

5.1.5.1 Precisão intra-ensaio

A Tabela 3 representa o estudo da precisão intermediária, repetitividade, no qual uma amostra de biodiesel metílico de soja foi preparada 10 vezes e em seguida analisada considerando o fator resposta previamente calculado em triplicata no mesmo dia das análises.

Tabela 3 - Estudo da precisão do método de coluna curta através do teste da precisão intra-ensaio (repetitividade) com uma amostra de biodiesel metílico de soja; SD-Desvio padrão.

| ANÁLISE | TEOR DE ÉSTERES (%) | F _R |
|---------|---------------------|----------------|
| 1 | 10,4 | 0,88241 |
| 2 | 9,9 | |
| 3 | 10,7 | |
| 4 | 9,5 | |
| 5 | 9,1 | |
| 6 | 9,2 | |
| 7 | 9,2 | |
| 8 | 9,9 | |
| 9 | 8,9 | |
| 10 | 10,4 | |
| MÉDIA | 9,6 | |
| SD | 0,6 | |

Fonte: Autor, 2016.

A avaliação da precisão intra-ensaio demonstrou que o método de coluna curta tem uma precisão de $\pm 0,6\%$, indicada pelo desvio padrão. Esse valor foi considerado no estudo da comparação dos métodos analítico empregados e seus respectivos desvios.

5.1.5.2 Precisão intermediária

Outra amostra, de biodiesel metílico de soja, foi a empregada no estudo da precisão intermediária (Tabela 4) expressa pelo desvio padrão relativo (coeficiente de variação). Além da variação da amostra neste procedimento de avaliação da precisão, as análises foram realizadas por um segundo analista em dias diferentes.

Tabela 4 - Estudo da precisão intermediária do método de coluna curta com uma amostra de biodiesel metílico de soja; desvio padrão (SD) desvio padrão relativo (RSD).

| ANÁLISE | TEOR DE ÉSTERES (%) | F _R |
|---------|---------------------|----------------|
| 1 | 7,5 | 0,8270 |
| 2 | 7,1 | |
| 3 | 8,0 | |
| 4 | 8,0 | |
| 5 | 8,3 | |
| 6 | 8,0 | |
| 7 | 8,7 | |
| 8 | 8,3 | |
| 9 | 9,0 | |
| 10 | 8,9 | |
| MÉDIA | 8,2 | |
| SD | 0,6 | |
| RSD | 7,3 | |

Fonte: Autor, 2016.

Como apresentado na Tabela 4, o estudo da precisão intermediária apresentou um desvio padrão igual ao obtido no estudo da repetitividade, Tabela 3. Quanto ao desvio padrão relativo encontrado, 7,3%, este se mostrou 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).

5.1.6 Robustez

Na Tabela 5 está representado o comportamento da resposta do método em termos de conversão de triacilglicerídeos em ésteres metílicos de uma amostra aleatória de biodiesel de soja metílico.

Tabela 5 - Modificações realizadas durante o teste da robustez do método de coluna curta e resposta obtida com uma amostra de biodiesel metílico de soja.

| Solvente | Conversão % ($\pm 0,6$) | | Média |
|------------------------|---|------|--------------|
| Hexano | 9,6 | 9,4 | 9,5 |
| 2-propanol/ Tolueno | 10,5 | 10,3 | 10,4 |
| Hexano/ NaCl | 10,3 | 10,0 | 10,1 |

Fonte: Autor, 2016.

Considerando o erro determinado através do estudo da precisão do método, desvio padrão igual à 0,6, o método demonstrou ser robusto, visto que, o mesmo não demonstrou variações significativas nos valores de conversão frente à modificação do solvente utilizado no preparo da amostra e modificação na força iônica da amostra.

Lembrando que, a mistura de solvente (2-propanol/ tolueno) foi empregada para dissolver a amostra, visto que, essa mesma mistura já foi empregada em estudos anteriores na determinação do índice de acidez do biodiesel de soja e de sebo bovino de acordo com a norma ASTM D664-11. Como serão testadas várias matérias-primas, a mudança de solvente é fundamental nesta metodologia de coluna curta.

5.1.7 Exatidão

Como descrito no capítulo 4, o método de coluna curta foi comparado com as duas metodologias de referência, o método oficial de GC, a da EN 14103, indicado pela ANP e o método de HPLC-UV também utilizado no GCaR.

5.1.7.1 Biodiesel metílico de soja

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados do teor de ésteres metílicos das amostras de biodiesel de soja, obtidas com diferentes condições reacionais e analisadas nas três metodologias: GC-coluna curta, EN 14103 e HPLC-UV.

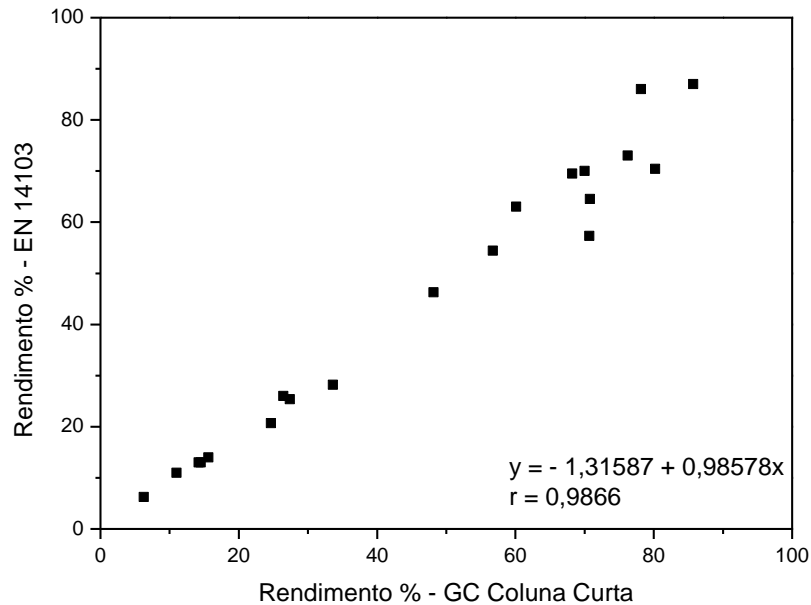
Tabela 6 - Comparação dos resultados, em % de ésteres metílicos do biodiesel de soja, obtidos nos métodos GC-coluna curta, EN 14103 e HPLC-UV.

| AMOSTRA | RENDIMENTO EM ÉSTERES METÍLICOS D SOJA (%) | | |
|---------|--|-------------------------|---------------------|
| | GC-coluna curta ($\pm 0,6$) | EN 14103 GC (± 1) | HPLC-UV (± 1) |
| 1 | 6,2 | 6 | 8 |
| 2 | 11 | 11 | 13 |
| 3 | 14,2 | 13 | 17 |
| 4 | 26,4 | 26 | 28 |
| 5 | 57,0 | 54 | 57 |
| 6 | 70,7 | 64 | 69 |
| 7 | 80,2 | 70 | 82 |
| 8 | 25,0 | 21 | 26 |
| 9 | 27,0 | 25 | 29 |
| 10 | 68,2 | 69 | 68 |
| 11 | 15,6 | 14 | 17 |
| 12 | 14,5 | 13 | 16 |
| 13 | 58,6 | 57 | 55 |
| 14 | 85,7 | 87 | 87 |
| 15 | 72,4 | 72 | 70 |
| 16 | 70,0 | 70 | 70 |
| 17 | 33,0 | 28 | 33 |
| 18 | 78,1 | 86 | 81 |
| 19 | 48,1 | 46 | 46 |
| 20 | 60,1 | 63 | 59 |

Fonte: Autor, 2016.

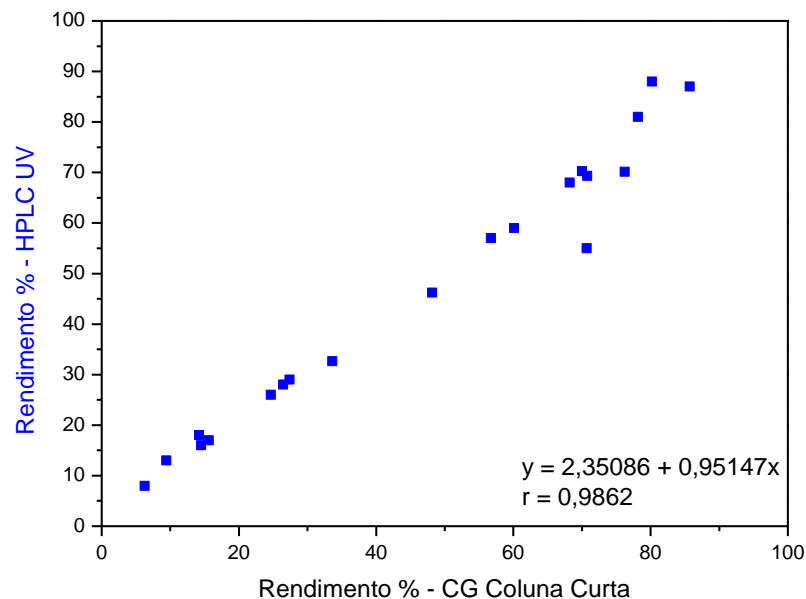
As Figuras 17 e 18 demonstram, graficamente, os resultados apresentados na Tabela 6, ou seja, o grau de concordância entre os métodos GC-Coluna curta e EN 14103, e entre os métodos GC-Coluna curta e HPLC-UV, respectivamente.

Figura 17 - Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e EN 14103 para as análises do biodiesel metílico de soja em diferentes concentrações de ésteres.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 18 - Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e HPLC-UV para as análises do biodiesel metílico de soja em diferentes concentrações de ésteres.



Fonte: Autor, 2016.

A partir da análise dos gráficos nas Figuras 17 e 18, foram determinados, matematicamente, os valores para os coeficientes de correlação, $r = 0,9966$, para a comparação do método GC- coluna curta com a metodologia EN 14103 e, $r = 0,9962$ para a comparação do método GC- coluna curta com a metodologia com o método de HPLC-UV.

Este coeficiente indica o quanto o método explica os valores observados, isto é, a coerência dos resultados obtidos. Quanto mais próximo de 1, maior a correlação positiva e, considerando estes valores de r para as comparações do método GC-coluna curta com as metodologias de referência, indica que o mesmo é exato e apresentou boas correlações com ambos os métodos de referência para determinação de ésteres metílicos de amostras de biodiesel de soja.

5.1.7.2 Biodiesel etílico de soja

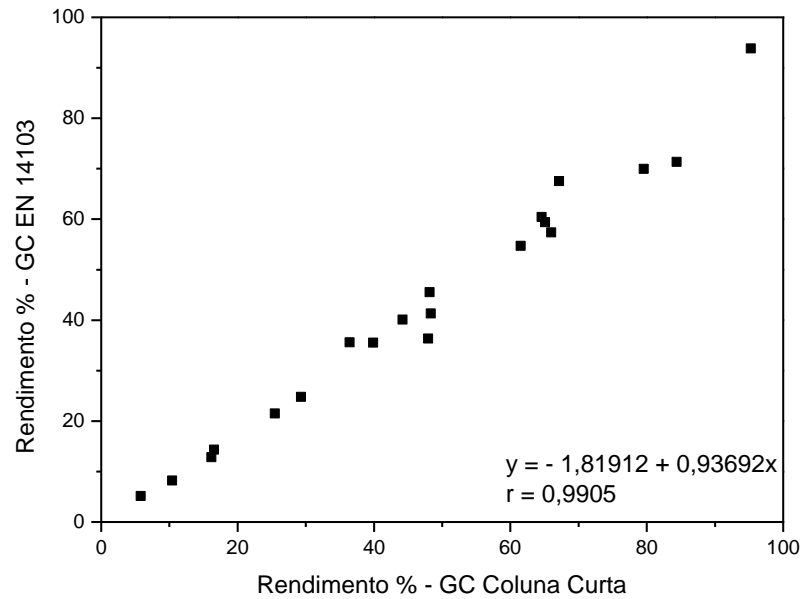
Na Tabela 7 estão apresentados os resultados do teor de ésteres etílicos em amostras de biodiesel de soja, obtidas com diferentes condições reacionais e analisadas nas três metodologias: GC-coluna curta, EN 14103 e HPLC-UV.

Tabela 7 - Comparação dos resultados, em % de ésteres etílicos do biodiesel de soja, obtidos nos métodos GC- coluna curta, EN 14103 e HPLC-UV.

| AMOSTRA | RENDIMENTO EM ÉSTERES ETÍLICOS (%) | | |
|---------|------------------------------------|-------------------------|------------------|
| | GC coluna curta ($\pm 0,6$) | EN 14103 GC (± 1) | HPLC (± 1) |
| 21 | 5,8 | 5 | 7 |
| 22 | 10,4 | 8 | 11 |
| 23 | 16,1 | 13 | 17 |
| 24 | 16,5 | 14 | 18 |
| 25 | 36,4 | 36 | 37 |
| 26 | 29,3 | 25 | 29 |
| 27 | 48,3 | 41 | 47 |
| 28 | 61,5 | 55 | 62 |
| 29 | 48,1 | 46 | 49 |
| 30 | 25,0 | 21 | 27 |
| 31 | 67,1 | 68 | 63 |
| 32 | 95,2 | 94 | 90 |
| 33 | 44,2 | 40 | 42 |
| 34 | 65,0 | 59 | 58 |
| 35 | 79,5 | 70 | 77 |
| 36 | 64,6 | 60 | 58 |
| 37 | 84,4 | 71 | 85 |
| 38 | 47,9 | 36 | 47 |
| 39 | 39,9 | 36 | 39 |
| 40 | 66,0 | 57 | 65 |

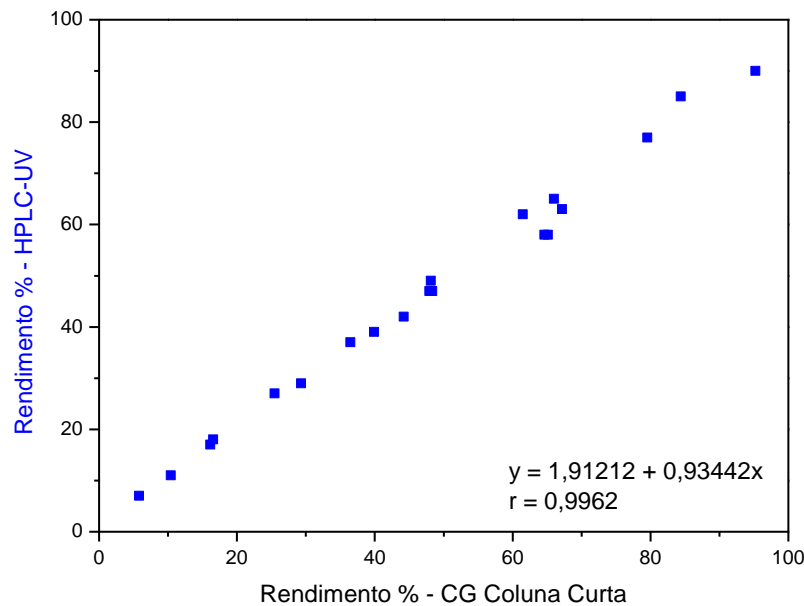
As Figuras 19 e 20 demonstram, graficamente, o grau de concordância entre os resultados, apresentados na Tabela 7, entre o método GC-coluna curta e EN 14103, e entre os métodos GC-coluna curta e HPLC-UV, respectivamente.

Figura 19 - Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e EN 14103 para as análises do biodiesel etílico de soja em diferentes concentrações de ésteres.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 20 - Gráfico da comparação das metodologias GC-coluna curta e HPLC-UV para as análises do biodiesel etílico de soja em diferentes concentrações de ésteres.



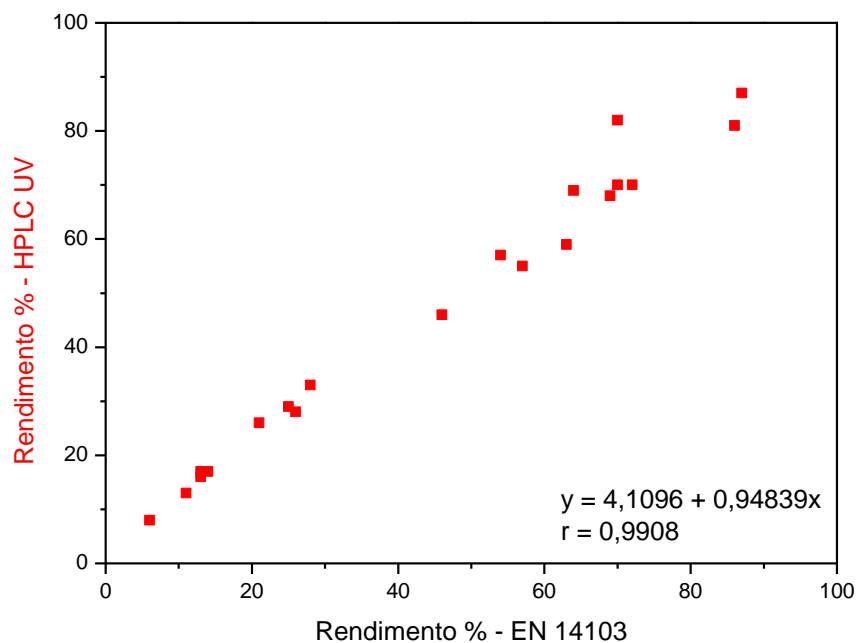
Fonte: Autor, 2016.

A partir da análise dos gráficos apresentados nas Figuras 19 e 20, foram determinados, matematicamente, o valor para o coeficiente de correlação, $r = 0,9905$ para a comparação entre o método GC-coluna curta e a norma EN14103 e, $r = 0,9962$ para a correlação entre os métodos CG-coluna curta e HPLC-UV na análise de amostras de biodiesel etílico de soja, de forma que, o método GC-coluna curta também apresentou boas correlações e excelente exatidão.

Além da comparação da metodologia em uso no GCaR com as metodologias de referência, HPLC-UV e EN 14103, estas últimas foram comparadas entre si, tanto para a análise de biodiesel de soja metílico quanto etílico,

A Figura 21 apresenta o gráfico da comparação da metodologia baseada em HPLC-UV com a metodologia EN 14103 para a análise de amostras de biodiesel metílico de soja.

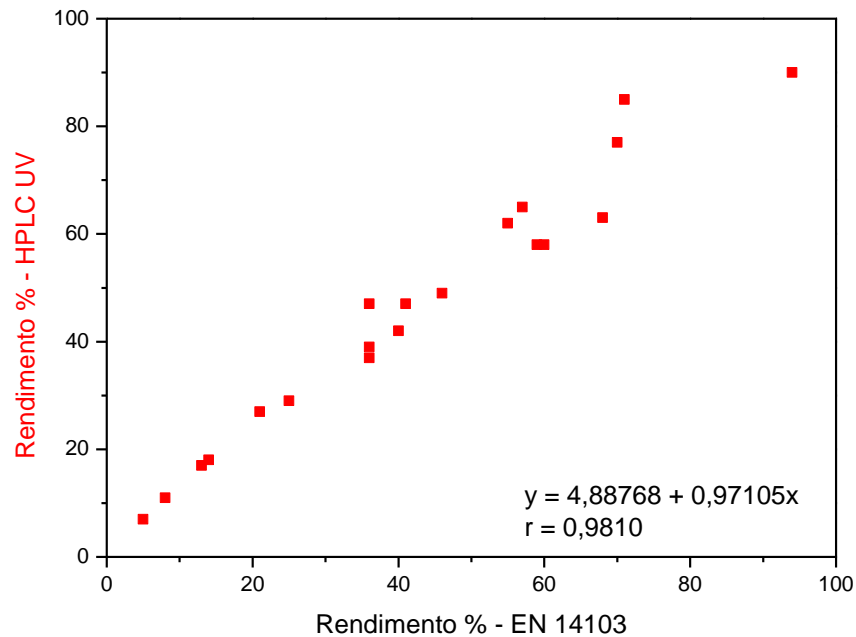
Figura 21 - Comparação das metodologias de referência quanto a análise de biodiesel metílico de soja.



Fonte: Autor, 2016.

A Figura 22 apresenta o gráfico da comparação da metodologia baseada em HPLC-UV com a metodologia EN 14103 para a análise de amostras de biodiesel etílico de soja.

Figura 22 - Comparação das metodologias de referência quanto a análise de biodiesel etílico de soja.



Fonte: Autor, 2016.

Através da análise dos gráficos apresentados nas Figuras 21 e 22, foram calculados os valores para os coeficientes de correlação, sendo, $r = 0,9908$ para a comparação dos métodos de referência para amostras de biodiesel metílico de soja, e $r = 0,9810$ para a comparação dos métodos quanto a análise de biodiesel etílico de soja.

Assim foi possível verificar a maior correlação entre o método em uso no GCaR com as metodologias de referência quando comparados os coeficientes determinados para cada situação.

5.1.7.3 Ensaio de recuperação

A Tabela 8 contém os resultados obtidos para os testes de recuperação com a amostra 2 (11% em ésteres metílicos) fortificada com B100 metílico de soja em 3 níveis de fortificação.

Tabela 8 - Ensaio de recuperação com a amostra 2 fortificada com biodiesel padrão (B100) metílico de soja.

| Massa da amostra (g) | B100 Adicionado (g) | R ^a (%) | Recuperação (g) | Recuperação (%) | Recuperação Média (%) | SD ^b | RSD ^c (%) |
|----------------------|---------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|----------------------|
| 0,1048 | 0,0334 | 32,2 | 0,0329 | 98,62 | 97,10 | 1,95 | 2,00 |
| | | 31,3 | 0,0317 | 94,90 | | | |
| | | 32,0 | 0,0327 | 97,80 | | | |
| 0,1008 | 0,0510 | 37,5 | 0,0458 | 89,81 | 90,44 | 0,79 | 0,87 |
| | | 37,6 | 0,0460 | 90,11 | | | |
| | | 38,0 | 0,0465 | 91,30 | | | |
| 0,1004 | 0,0706 | 47,0 | 0,0692 | 98,15 | 97,90 | 1,83 | 1,87 |
| | | 46,1 | 0,0678 | 95,97 | | | |
| | | 47,6 | 0,0703 | 99,61 | | | |

Fonte: Autor, 2016.

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

Na Tabela 8 observa-se que no menor nível de fortificação (0,0310 g de B100) a recuperação apresentou maior variação, por isso neste nível foi obtido o maior desvio padrão relativo. 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 semimicro, esperava-se erros maiores que 1 a 2%, logo o método GC-coluna curta é bastante preciso.

Conforme encontrado na literatura, os valores encontrados para os ensaios de recuperação permaneceram dentro do intervalo permitido tanto para análise de resíduos (entre 70 e 120%), quanto no caso de amostras mais complexas, 50 – 120%, (RIBANI et al., 2004). Logo, o método é exato.

Além disso, de acordo com o manual da Associação oficial de químicos analíticos, *do inglês Association of Official Analytical Chemists – AOAC*, os valores encontrados para o estudo de recuperação estão entre o intervalo aceitável, 95 - 105%, para recuperação de analitos em concentrações $\leq 0,1$ (BRITO e al, 2003).

Foi realizado o tratamento estatístico do estudo de recuperação aplicando o teste de significância *t* de *student* de acordo com a seguinte equação 06:

$$|t_{exp}| = \frac{(Rec - 100)\sqrt{n}}{S_{Rec}} \quad (06)$$

Onde: *Rec* é a média de recuperação do método, *n* o número de amostras ($n = 3$) e S_{Rec} o desvio padrão das médias de recuperação de cada nível de fortificação (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

O valor calculado, $t_{exp} = 2,05$ foi menor que o valor $t_{tabelado} = 4,3$ com 95% de confiança e $n - 1$ graus de liberdade. Como $t_{exp} \leq t_{tabelado}$, o método GC-coluna curta foi considerado exato.

5.2 Resumo das figuras de mérito avaliadas durante a validação da metodologia de coluna curta e respectivos indicadores

Na tabela 9, constam os parâmetros analisados para a validação da metodologia baseada em cromatográfica gasosa com coluna curta empregada na análise de biodiesel metílico do óleo de soja e os resultados obtidos para cada propriedade:

Tabela 9 – Figuras de mérito avaliadas no processo de validação da metodologia GC-coluna curta aplicada à análise de biodiesel metílico do óleo de soja.

| Figura de mérito | Método de análise | Indicadores |
|---------------------------------|---|---|
| Seletividade | Comparação de cromatogramas | Seletivo |
| Faixa de trabalho e linearidade | Curva analítica com padronização interna | 0,02 gmL^{-1} – 0,17 gmL^{-1} |
| Limite de detecção | Parâmetros da curva analítica | 0,0067 gmL^{-1} |
| Limite de quantificação | Parâmetros da curva analítica | 0,0204 gmL^{-1} |
| Sensibilidade | Coefficiente angular da curva analítica | Sensível |
| Exatidão | Comparação com métodos de referência | $\geq 0,99$ |
| | Ensaio de recuperação | 90,44% - 97,90 |
| Precisão | Repetitividade | SD = 0,6 |
| Precisão | Precisão intermediária | SD = 0,6; RSD = 7,3 |
| Robustez | Variações nas condições de preparo da amostra | Robusto |

Fonte: Autor, 2016.

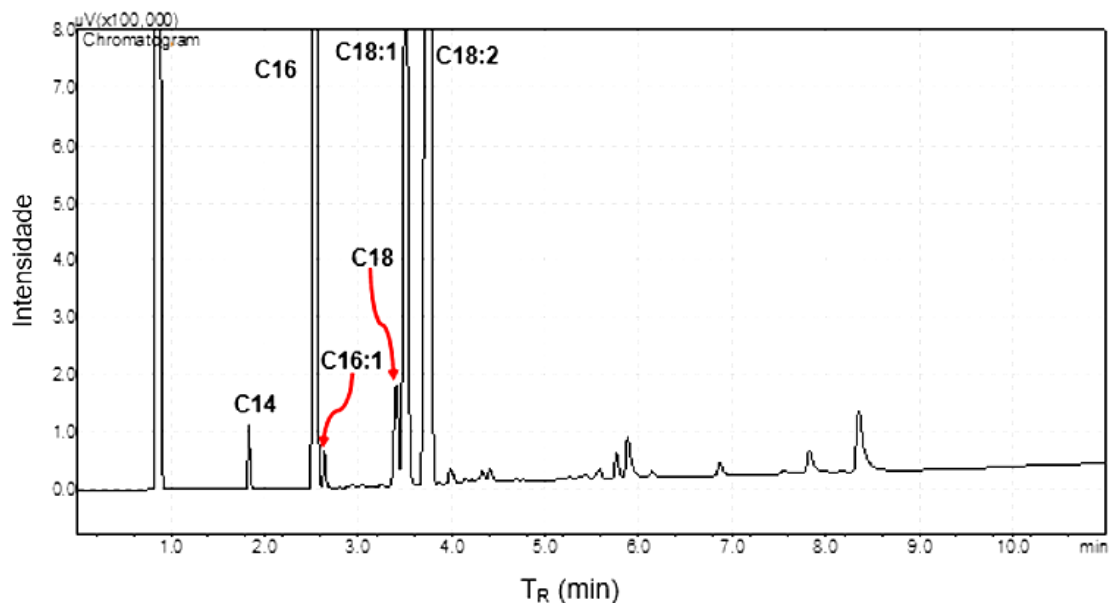
5.3 Aplicação da metodologia GC-coluna curta para a análise de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas

Inicialmente, 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 para aplicação da Norma Europeia 14103 na determinação de ésteres metílicos produzidos. Estes resultados foram comparados com a reposta obtida através do método GC-coluna curta.

5.3.1 Determinação da composição dos óleos e gorduras em termos de ácidos graxos

Na Figura 23 é apresentado o cromatograma do biodiesel padrão, com 100% de conversão, produzido a partir do óleo de algodão, para representar a metodologia utilizada na caracterização das matérias-primas em teor de ácidos graxos.

Figura 23 - Cromatograma do B100 de óleo de algodão obtido no método de caracterização em termos de ácidos graxos.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: Ésteres de ácido graxo: C14:0 – mirístico, C16:0 – palmítico, C16:1 – palmitoléico, C18:0 - esteárico; C18:1 - oleico, C18:2 – linoléico; T_R é o Tempo de retenção;

Ao comparar os tempos de retenção dos picos do cromatograma do B100 de óleo de algodão, Figura 23, com o cromatograma da análise de padrões de ésteres metílicos injetados nas mesmas condições instrumentais, foi possível identificar e quantificar os ácidos graxos constituintes do óleo de algodão. Da mesma forma, foi realizada a caracterização dos demais materiais graxos avaliados, cujos perfis em ácidos graxos estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição em ácidos graxos, determinada por GC, para os óleos avaliados durante o projeto.

| ÓLEO | ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS (% 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>Canola</i> | - | - | - | - | 4,9 | 0,2 | 0,2 | 66,8 | 19,9 | 8,0 | - | - |
| <i>Coco</i> | 5,2 | 4,2 | 40,1 | 20,9 | 12,6 | - | 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>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>Soja</i> | - | - | - | - | 11,6 | - | 3,0 | 24,6 | 54,2 | 6,7 | - | - |

Fonte: Autor, 2016.

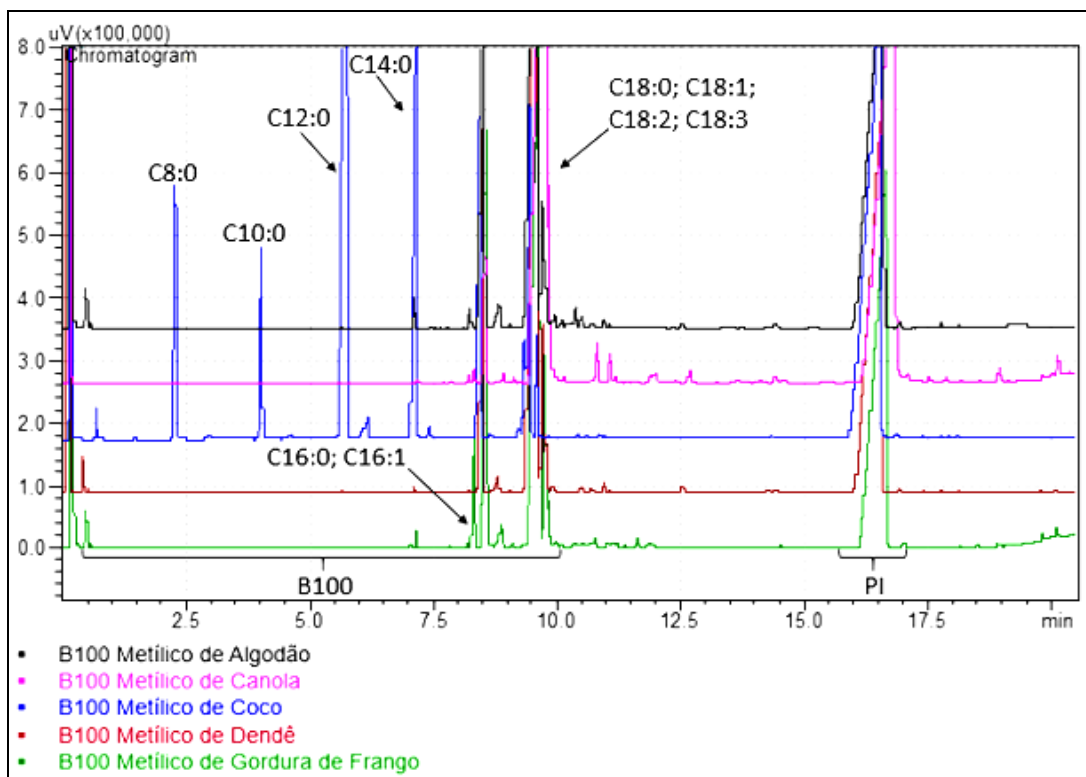
Os perfis de ácidos apresentado na Tabela 9 foram utilizados para o cálculo da massa molecular dos triacilglicerídeos dos materiais graxos empregados na produção de biodiesel e, conseqüentemente, determinar as relações molares dos reagentes nas reações de transesterificação de cada tipo de material graxo.

5.3.2 Análises de amostras de biodiesel provenientes de outras matérias primas

Para esta etapa do estudo, foram produzidos os padrões analíticos de biodiesel e três amostras para cada matéria-prima com álcool metílico.

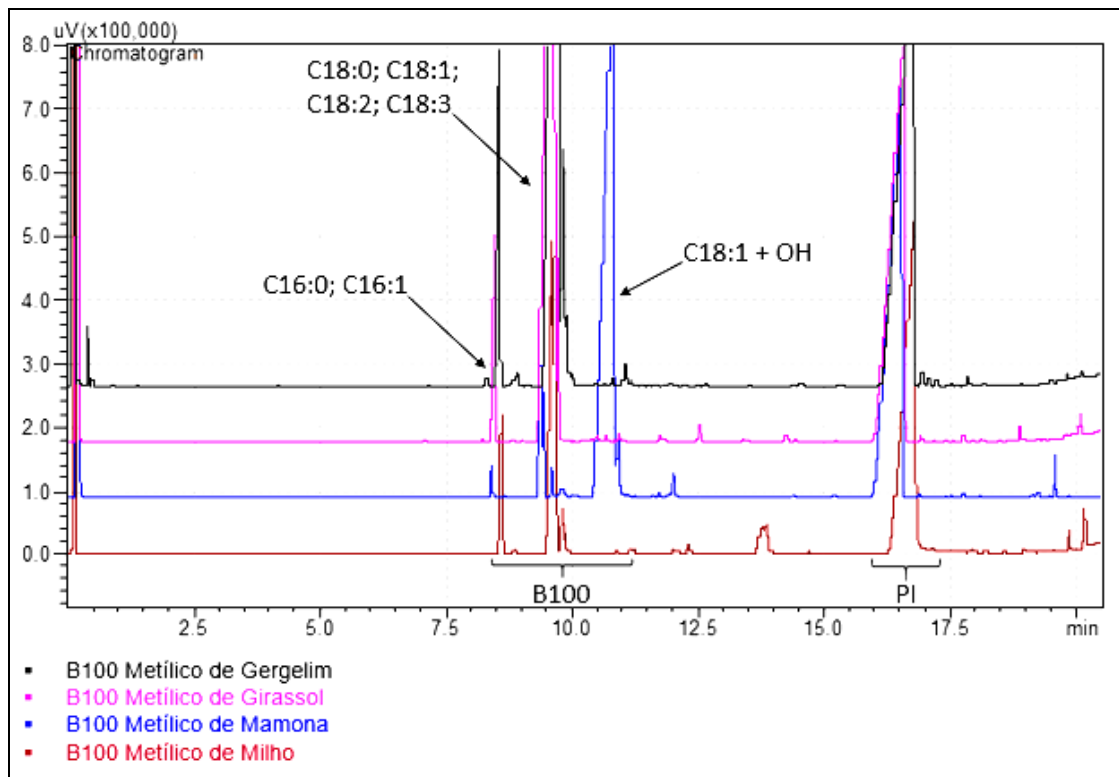
As Figuras 24 e 25, mostram os cromatograma do biodiesel padrão de cada matéria graxa empregada na produção de biodiesel, todos analisados para o cálculo dos fatores resposta.

Figura 24 - Cromatogramas de B100 de algodão, canola, coco, dendê e gordura de frango, analisados no método GC-coluna curta para a determinação dos fatores resposta.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 25 - Cromatogramas de B100 de gergelim, girassol, mamona e milho, analisados no método GC- coluna curta para a determinação dos fatores respota.



Fonte: Autor, 2016.

Todas as amostras de biodiesel metílico foram analisadas no método GC- coluna curta e no método da EN 14103 para comparação dos resultados, conforme demonstrados na Tabela 11.

A metodologia de HPLC não foi aplicada, visto que, muitos materiais graxos não podem ser analisados sob as condições desta metodologia pois, contaminam a coluna cromatográfica por precipitação. Além disso, os cromatogramas da análise de destes tipos de biodiesel apresentam algumas coeluições dos picos de monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos.

Tabela 11 - Estudo comparativo do teor de ésteres metílicos em amostras de biodiesel de outras matérias primas analisadas no método GC-coluna curta e EN 14103.

| MATÉRIA-PRIMA | RENDIMENTO EM ÉSTERES ETÍLICOS (%) | | |
|---------------|------------------------------------|-------------------------|----|
| | GC-coluna curta ($\pm 0,6$) | EN 14103 GC (± 1) | |
| Algodão | 14,3 | 13 | |
| | 43 | 43 | |
| | 63,5 | 62 | |
| Canola | 17,0 | 15 | |
| | 34,2 | 28 | |
| | 41,4 | 40 | |
| Coco | 48,8 | 23 | |
| | 62,0 | 32 | |
| | 68,7 | 32 | |
| Dendê | 30,8 | 31 | |
| | 40,0 | 39 | |
| | 51,6 | 51 | |
| Gergelim | 7,7 | 6 | |
| | 8,8 | 7 | |
| | 44,1 | 40 | |
| Girassol | 11,0 | 9 | |
| | 40,0 | 40 | |
| | 54,5 | 53 | |
| Gordura | 27,2 | 23 | |
| | De | 43,0 | 40 |
| | Frango | 65,4 | 57 |
| Mamona | 22,6 | 16 | |
| | 25,2 | 20 | |
| | 65,2 | 52 | |
| Milho | 6,9 | 5 | |
| | 40,4 | 34 | |
| | 54,3 | 54 | |

Fonte: Autor, 2016.

De acordo com os resultados obtidos na determinação de ésteres metílicos e desvios padrões de ambos os métodos, o método GC-coluna curta apresentou coerência com o método EN 14103 nas análises do biodiesel metílico de algodão,

dendê e girassol. Para o biodiesel das demais matérias primas ocorreram bastantes variações.

Em relação ao biodiesel de coco, a explicação referente a diferença na resposta da metodologia validada é em relação a deficiência do método da norma EN 14103, visto que, esta foi desenvolvida e aplicada para amostras de biodiesel proveniente de matérias-primas que apresentam apenas ésteres de C14 a C24 em suas composições, enquanto o biodiesel de coco apresenta C8, C10 e C12.

A explicação destas variações para as outras matérias-primas parece estar associada ao grau de refinamento destes óleos e gorduras, visto que, o biodiesel produzido a partir da gordura de frango foi o que apresentou maiores discrepâncias. As outras amostras apresentaram pequenos erros e sempre para valores maiores que os obtidos através da EN 14103. Isto deve-se ao fato de que na metodologia de coluna curta calcula-se o fator resposta e este é feito com base no biodiesel padrão, ou seja, havendo impurezas na amostra, a massa medida para o cálculo do fator resposta não irá corresponder de forma real aos picos integrados. Pode-se verificar estas informações nas Figuras 24 e 25 onde são observados picos indefinidos entre 10 e 15 minutos para as amostras de biodiesel que apresentam discrepâncias.

6 CONCLUSÕES

O método GC-coluna curta, baseado na normalização interna com fator resposta tem boa seletividade para separar e identificar todos os constituintes da amostra e determinar o conteúdo total de ésteres alquílicos em amostras de biodiesel metílico e etílico de soja.

Os limites de detecção e quantificação obtidos são valores significativamente baixos e permitem ao analista trabalhar com pequenos níveis de concentração sem afetar a confiabilidade de precisão aceitável, seja para separar, identificar ou quantificar o ésteres alquílicos.

Considerando o erro determinado através do estudo da precisão do método, desvio padrão igual à 0,6, o método demonstrou ser robusto, visto que, o mesmo não demonstrou variações significativas nos valores de conversão frente à modificação do solvente utilizado no preparo da amostra e da força iônica do meio.

O método apresentou uma ótima precisão, tanto no teste da repetitividade quanto na precisão intermediária, com um desvio padrão menor que as metodologias de referência e coeficiente de variação dentro do permitido.

Os valores encontrados para o fator de correlação, r , calculados para a comparação das três metodologias, indicaram boas correções e a excelente exatidão do método GC-coluna curta.

O melhor nível de recuperação foi obtido em amostras fortificadas com o nível mais próximo do limite de quantificação.

De acordo com os resultados obtidos na determinação de ésteres metílicos de matérias graxas estudadas na segunda etapa no trabalho, o método GC-coluna curta apresentou resultados semelhantes aos obtidos com o método EN 14103 para a análise do biodiesel metílico de algodão, dendê e girassol. Em relação ao óleo de coco, a metodologia validada é mais eficiente que a norma EN 141013. Quanto as outras matérias-primas, pode-se perceber que é necessário que estes óleos e gorduras sejam refinados para evitar erros na determinação do fator resposta.

O método GC-coluna curta é sensível e robusto, visto que, não sofreu variações significativas na determinação do teor de éteres quando variadas as condições de preparo da amostra.

7 PERSPECTIVAS

Construir a curva analítica para o método GC-coluna curta utilizado padrão analítico de biodiesel etílico de soja.

Aplicar um estudo estatístico através de quimiometria no tratamento dos cromatogramas obtidos, utilizando análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA, do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) para a análise exploratória dos dados e avaliar se o método é válido para todos os tipos de matérias-prima testados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. B. G.; MATTA, M. H. R.; MONTAGNER, E. 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. **Resolução ANP Nº 45, de 25.8.2014**, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS; **Boletim mensal do biodiesel novembro de 2015**, 2015.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224–2234, 2009.
- BARROS, T. D.; JARDINE, J. D.; **Gordura animal**; Agencia Embrapa de informação tecnológica; <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1om7kf02wyiv802hvm3jholyo0m.html>; Acesso em 24-11-2014, às 02:23h.
- BOEF, G. D.; HULANICKI, A. Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry; **Pure Appl. Chem.** v. 55, p. 553, 1983.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- BRUCE, P.; Minkinen, P.; Riekkola, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, v.128, p. 93-106, 1998.
- CANESIN, E. A.; OLIVEIRA, C. C.; MATSUSHITA, M.; DIAS, L. F.; PEDRÃO, M. R.; SOUZA, N. E.; Characterization of residual oils for biodiesel production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 39–45, 2014.
- CARVALHO, M. S.; MENDONÇA, M. A.; PINHO, D. M. M.; RESCKC, I. S.; SUAREZ, P. A. Z. Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 763-769, 2012.

- CHATTOPADHYAY, S.; KAREMORE, A.; DAS, S.; DEYSARKAR, A.; RAMKRISHNA, S. Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. **Applied Energy**, v.88, p. 5188, 2011.
- CHONGKHONG, S.; TONGURAI, C.; CHETPATTANANONDH, P.; BUNYAKAN, C. Biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. **Biomass Bioenergy**, v. 31, p. 563–568, 2007.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2006.
- CORTES, H. J.; WINNIFORD, B.; LUONG, J.; PURSCH, M. Comprehensive two dimensional gas chromatography review. **J. Sep. Sci.** v. 32, p. 883 – 904, 2009.
- CRUZ, R. S.; LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.
- CUNHA, M. E.; KRAUSE, L. C.; MRAES, M. S. A.; FACCINI, C. S.; JACQUES, R. A.; ALMEIDA, S. R.; RODRIGUES, M. R. A.; CARAMÃO, E. B. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 570-575, 2009.
- DAS, S.; CHATTOPADHYAY, S.; SEM, R.; Rapid and precise estimation of biodiesel by high performance thin layer chromatography; **Applied Energy**, v. 88, p. 5188–5192, 2011.
- 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, 2001.
- ERNI, F.; STEUER, W.; BOSSHARDT, H. Automation and validation of HPLC-systems; **Chromatographia**, v. 24, p. 201, 1987.
- FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. 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, p. 174–183, 2007.
- FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia; **Química Nova**, v. 28, n. 19, 2005.
- FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; NOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 61, p. 1638-1643, 1984.

GAMA, P. E.; GIL, R. A. 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.

GOMES, F. P.; **Curso de Estatística Experimental**, ed. 13, Nobel, 1990.

GONZAGA, L. V.; MORETTO, E.; FETT, R. **Introdução à Ciência de Alimentos**. Universidade Federal de Santa Catarina, v. 255, 2002.

HAAS, M. J.; FOGLIA, T. A. Alternate Feedstocks and Technologies for Biodiesel Production. In: KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J., **The Biodiesel Handbook**, Cap. 4.2. AOCS Press Champaign, 2005.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; MCDOWALL, R.D. validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 193–218, 1998.

HOLCAPEK, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by highperformance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 1, p. 13–31, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-GCCRE-008, 2011.

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.

KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **JAACS**, v. 83, n. 10, 2006.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 669-677, 2007.

KROHN, B. J.; MCNEFF, C. V.; YAN, B.; NOWLAN, D. Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic MGCyan® process. **Bioresour Technol.**, v. 102, p. 94–100, 2011.

LANÇAS F. M. Cromatografia em fase gasosa; **Rev Quim. Indl.**, v. 55, n.40, 1986.

LANÇAS F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**; Átomo, 2009.

LANÇAS, F. M; **Métodos cromatográficos de análise**; RIMA, 2004.

LEHNINGER, A.; NIELSON, D.L.; COX, M.M. **Bioquímica**. ed. 3, New York: Worth Publisher, p. 1152, 1995.

LEITE, F.; **Validação em Química Analítica**; ed. 5, Átomo, 2008.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Ind. Eng. Chem.** v. 44, p. 5353- 5363, 2005.

MAHAJAN S.; KONAR, S. K.; BOOCOOCK, G.B. Standard biodiesel from soybean oil by a single chemical reaction. **JAACS**, v. 83, n. 7, p. 641, 2006.

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.

MCNAIR, H. M.; LANÇAS, F. M.; GALHIANE, M. S.; Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE. Rev. **Quim. Ind.**, v. 54, p. 301-306, 1985.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review .renewable and sustainable. **Energy Reviews**, v. 10, p. 248–268, 2006.

MEIRA, M.; QUINTELLA, C. M.; NETO, P. R. C. PEPE, I. M.; RIBEIRO, E. M. O.; SILVA, W. L., CID, A. L. D.; GUIMARÃES, A. K. 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.

MENDONÇA, D. R. **Emprego de catalisadores de estanho (IV) em reações transesterificação: obtenção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

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.

MENEGHETTI, S. M. P. et al. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, n. 30, p. 667-676, 2007.

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

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA; **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, v. 96, 2016.

MITTELBACH, M.; ROTH, G.; BERGMANN, A.; Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel. **Chromatographia**, v. 42, p. 431–4, 1996.

MONTEIRO, M. R. et al. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v. 77, p. 593–605, 2008.

MORAES, M. S. A. et al. Uso da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) na caracterização de misturas biodiesel/diesel: aplicação ao biodiesel de sebo bovino. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1188-1192, 2011.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. **Varela**, v. 150, 1998.

NETO P. R. C.; CARO M. S. B.; MAZZUCO L. M.; NASCIMENTO M. G. Quantification of soybean oil ethanolysis with ¹H NMR. **J Am Oil Chem. Soc.**, v. 81, p. 1111–4, 2004.

NICOLA, G. D. et al. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 120–126, 2008.

OLIVEIRA, J. S. et al. Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by ftir-atr and ftnir spectroscopies. **Talanta**, v. 69, p. 1278-1284, 2006.

PEIXOTO, M. Antecedentes históricos e proposições legislativas em tramitação. in: a utilização de óleo vegetal refinado como combustível - aspectos legais, técnicos, econômicos, ambientais e tributários. Centro de estudos da consultoria do senado, 2010.

PINTO, A. C. et al. Biodiesel: an overview. B. **J. Braz Chemical Society** v. 16, p. 1313, 2005.

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, p. 8992–8997, 2009.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, v. 27, p. 60-67, 2007.

REFAAT, A. A. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. **Int. J. Environ. Sci. Tech.**, v. 6, p. 677-694, 2009.

RIBANI, R. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771, 2004.

SANTOS, R. C. R.; VIEIRA, B. V.; 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, n. 46–50, 2013.

- 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 2015, às 22:57.
- SCHEUFELE, F. B. et al. Synthesis of ethyl esters from crude macauba oil (*acrocomia aculeata*) for biodiesel production. **Fuel**, v. 165, p. 360–366, 2016.
- SCHOBBER, S. et al. A method for the determination of polyunsaturated fatty acid methyl esters in biodiesel: results of an interlaboratory study. **J. Lipid Sci. Technol.**, v. 111, p. 829–834, 2009.
- SCHUCHARDT, U., SERCHELI R., VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **J Braz Chemistry Society**, v.9, n. 1, p. 199-210, 1998.
- SEELEY J. V. et al. Analysis of biodiesel/petroleum diesel blends with comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J Chromatogr. Sci.**, v. 45, n. 10, p. 650-656, 2007.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of The US food and drug administration, The US pharmacopeia and the international conference on harmonization; **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57–66, 2003.
- SHANG, N. C. et al. Characterization of fatty acid methyl esters in biodiesel using high-performance liquid chromatography. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 354–359, 2012,
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Cengage Learning, 2006.
- SOUSA, F. P. et al. Thermogravimetry and viscometry for assessing the ester content (fame and faee). **Fuel Processing Technology**, v. 109, p. 133–140, 2013.
- SOUZA, L. C.; ROCHA, E. D.; ROCHA, C. P. Análises de óleos vegetais e óleo residual bruto por cromatografia gasosa visando à produção do biodiesel. **Conexão Ciência- UNIFOR-MG**, v. 8, n. 2, p. 85-91, 2013.
- SUAREZ, P. A. Z. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 768-775, 2009.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Frequently asked questions about analytical method validation. **Pharm. Technol.**, v. 2, n. 12, 1998.
- 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.
- TIYAPONGPATTANA, W.; WILAIRAT, P.; MARRIOTT P. J.; Characterization of biodiesel and biodiesel blends using comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J. Sep. Sci.**, v. 14, p. 2640-2649, , 2008

VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v. 19, n. 400-40, 1996.

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 GC; **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

WANG, R. et al. Seed Oil for Biodiesel Feedstock: Gas Chromatographic Fingerprint. **Appl. Energy**, v. 88, p. 2064–2070, 2011.

WOOD, R. How to Validate Analytical Methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, p. 624–632, 1999.

WORLD CUSTOMS ORGANIZATION. **The harmonized commodity description and coding system (HS)**. World Customs Organization, Brussels, Belgium, 2007.

ZAGONEL G. F.; ZAMORA P. P.; RAMOS L. P.; Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR. **Talanta**, v. 63, p.1021–5, 2004.

ZALIHA, O.; CHONG, C.L.; CHEOW, C.S. Crystallization properties of palma oil by fry fractionation. **Food Chemistry**, v. 30, n. 30-36, 2003.

ZAMBIAZI, R. C. et al. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **BCEPPA**, v. 25, n. 1, p. 111-120, 2007.