

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

CRISTIAN JOSÉ GIERTYAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA
A DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO GLICEROL

MACEIÓ

2016

CRISTIAN JOSÉ GIERTYAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
PARA A DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO GLICEROL**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química Analítica.

Orientadora: Prof. Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi

Coorientadora: Prof. Dra. Rusiene Monteiro de Almeida

MACEIÓ

2016

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

G454d Giertyas, Cristian José.
Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a determinação dos produtos de oxidação do glicerol / Cristian José Giertyas. – 2016.
90 f. : il., grafs., tabs.

Orientadora: Janaína Heberle Bortoluzzi.

Coorientadora: Rusiene Monteiro de Almeida.

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. 84-90.

1. Glicerol. 2. Oxidação. 3. Métodos cromatográficos. 4. Validação
I. Título.

CDU: 661.188



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

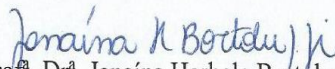


BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

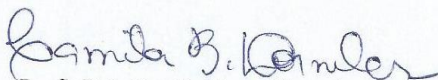
FOLHA DE APROVAÇÃO

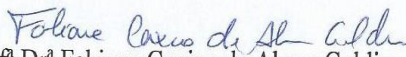
Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Cristian José Giertyas**, intitulada: **“Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a determinação dos produtos da oxidação do glicerol”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 23 de fevereiro de 2016, às 14h, na Sala de Aulas da Pós-Graduação do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Janaína Herbele Bortoluzzi
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a Dr.^a Ruscine Monteiro de Almeida
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a Dr.^a Camila Braga Dornelas
(ESENFAR/UFAL)


Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concebido a sabedoria, o discernimento e a compreensão para os pequenos e grandes adventos da vida.

A **professora Dra. Janaína H. Bortoluzzi** pela disponibilidade, a sabedoria, os ensinamentos constantes em todo o processo de orientação científica desta dissertação e por toda a paciência em me ajudar em tudo o que necessitei.

A professora **Dra. Rusiene Monteiro de Almeida**, pela coorientação científica desta dissertação.

A professora **Dra. Camila Braga Dornelas** e a professora **Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino** por aceitarem o convite para participação da banca desta dissertação de mestrado.

Aos meus pais **Eliseu Giertyas** e **Maria Elena Giertyas** por terem me incentivado a estudar desde criança, pelos ensinamentos e conselhos, mesmo estando distante passam a força necessária para a superação de todos os obstáculos encontrados no decorrer do caminho.

Ao meu irmão **Mateus Giertyas**, e as irmãs, **Karine Giertyas** e **Jéssica Giertyas** pela amizade e companheirismo, pelas palavras de apoio e incentivo.

Aos colegas de laboratório, em especial, **Jhosi, Micheli, Lucas, Filipe, Débora**, pelos momentos de descontração e pela troca de experiências vividas no laboratório bem, como ajuda nas análises e apoio.

Aos meus amigos que me acolheram em Maceió em 2013 em especial: **Larissa, Talma, Karly, Rosi, Araceli, Heway, Uadson, Marlon e Lúcio**, o meu muito obrigado por todos os momentos.

A outros colegas e professores do grupo GCaR, pela contribuição e pela amizade.

RESUMO

O biodiesel é um dos combustíveis renováveis mais promissores, pois pode ser obtido através de fontes de energia renováveis. Essa produção ocorre principalmente através de uma reação de transesterificação gerando biodiesel e glicerol. Uma das alternativas para o uso do glicerol é sua oxidação catalítica através de processos reacionais e o uso de catalisadores, os quais podem gerar uma gama de produtos com diferentes aplicações que abrangem desde a indústria farmacêutica até as indústrias petroquímicas. Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos analíticos, um baseado em cromatografia líquida (HPLC) e outro em cromatografia gasosa (GC) para a identificação, separação e quantificação destes produtos. Durante o desenvolvimento dos métodos foram utilizados 8 padrões analíticos. O método de HPLC foi validado através da verificação de parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, repetitividade, precisão intermediária, precisão instrumental, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Estes parâmetros foram avaliados levando-se em consideração tanto a área quanto à altura dos picos. As curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação $\geq 0,9978$. A metodologia proposta mostrou-se sensível e precisa para a faixa de concentração adotada de 1,3 a 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na precisão instrumental, precisão intermediária e repetitividade foram obtidos valores de CV $\leq 9,3\%$. A exatidão do método apresentou valores de recuperação de 89 a 108% tanto na amostra real como na matriz fortificada pelos padrões. O método proposto é robusto para pequenas variações de temperatura ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$). No método desenvolvido por cromatografia gasosa foi necessário realizar um pré tratamento das amostras, de forma a tornar os analitos estáveis termicamente, para posterior análise em GC. Este pré tratamento foi realizado através de uma reação de derivatização. Foram testados dois derivatizantes, BSTFA - N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida e MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) sendo escolhido o BSTFA que respondeu positivamente a todos os analitos de interesse em aproximadamente 15 minutos de reação. No método cromatográfico desenvolvido por GC foram necessários 20 minutos de análise, totalizando assim uma metodologia com o tempo total de 35 minutos.

Palavras chaves: Glicerol, Oxidação, Métodos cromatográficos, Validação

ABSTRACT

Biodiesel is one of the most promising renewable fuels, as can be obtained from renewable energy sources. This production mainly occurs through a transesterification reaction producing biodiesel and glycerol. An alternative to the use of glycerol is via a catalytic oxidation reaction processes and using catalysts which can generate a range of products with different applications ranging from the pharmaceutical industry to petrochemical industries. In this work two analytical methods were developed, one based on liquid chromatography (HPLC) and a gas chromatography (GC) for the identification, separation and quantification of these products. During the development of methods were used 8 analytical standards. The HPLC method was validated by checking parameters such as selectivity, linearity, precision, repeatability, intermediate precision, instrumental precision, accuracy, robustness, limit of detection and quantification limit. These parameters were evaluated taking into account both the area and the height of the peaks. The analytical curves showed a correlation coefficient $\geq 0,9978$. The proposed method was sensitive and need for concentration range adopted 1.3 to 55 mg L⁻¹. The instrumental precision, intermediate precision and repeatability were obtained CV values $\leq 9.3\%$. The method accuracy showed recovery values 89-108% in both the real sample and the matrix fortified by the standards. The proposed method is robust to small temperature variations (± 5 °C). In the method developed by gas chromatography it was necessary to perform a pretreatment of the samples in order to make thermally stable analytes for analysis in GC. This pretreatment was carried out by a derivatization reaction. two were tested derivatizing, BSTFA - N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide MSTFA - N-methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) being chosen BSTFA which responded positively to all analytes of interest in about 15 minutes of reaction. In the chromatographic method developed by GC it took 20 minutes of analysis, thus totaling a methodology with a total time of 35 minutes.

Key words: Glycerol, Oxidation, Chromatographic methods, validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos.	19
Figura 2 - Fontes renováveis para obtenção de biodiesel.	20
Figura 3 - Rota de oxidação do glicerol com catalisadores de platina.	22
Figura 4 - Valor em R\$ dos principais produtos da reação de oxidação do glicerol com base da cotação na Sigma-Aldrich em setembro de 2015.	24
Figura 5 - Cromatograma obtido na análise da amostra de uma reação enzimática 1 (3-hidróxi-propanaldeído), 2 (dihidroxiacetona) 3 (glicerol) 4 (1,3-propanodiol).	36
Figura 6 - Influência da concentração da fase móvel. 1 (ácido mesoxálico), 2(ácido tartrônico), 3 (gliceraldeído), 4(ácido glicérico), 5(glicerol), 6 (ácido glicólico) e 7 (dihidroxiacetona).	38
Figura 7 - Representação sistemática da reação de derivatização do glicerol com BSTFA. Onde X representa o grupo de saída do agente derivatizante... ..	40
Figura 8 - Estrutura da coluna MetaCarb H PLUS.	45
Figura 9 - Cromatograma obtido na análise da solução de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos padrões (1 ácido oxálico, 2 ácido tartrônico, 3 gliceraldeído, 4 ácido glicólico, 5 ácido láctico, 6 glicerol, 7 ácido fórmico e 8 ácido acético). Fase móvel H_3PO_4 10 mM (pH 2,08), fluxo $0,35 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna $35 \text{ }^\circ\text{C}$	49
Figura 10 - Parâmetros de avaliação da resolução em cromatografia.	50
Figura 11 - Efeito do pH na resolução dos compostos (4 –ácido glicólico, 5 –ácido láctico, 6 –glicerol e 7 –ácido fórmico).	51
Figura 12 - Variação do fluxo da fase móvel no pH 2,24 (1 -ácido oxálico, 2 -ácido tartrônico, 3 -gliceraldeído, 4 -ácido glicólico, 5 -ácido láctico, 6 -glicerol, 7 -ácido fórmico e 8 -ácido acético).	52

Figura 13 - Variação da temperatura da coluna (4 –ácido glicólico, 5 –ácido láctico, 6 –glicerol e 7 –ácido fórmico).....	54
Figura 14 - Cromatograma obtido com a análise dos padrões analíticos concentração 20 µg mL ⁻¹ nas condições ideais estabelecidas, 1- ácido oxálico, 2- ácido tartrônico, 3- gliceraldeído, 4- ácido glicólico, 5- ácido láctico, 6- glicerol, 7- ácido fórmico, 8- ácido acético.	56
Figura 15 - Seletividade obtida pela fortificação da matriz isenta de analitos 1- ácido oxálico, 2- ácido tartrônico, 3- gliceraldeído, 4- ácido glicólico, 5- ácido láctico, 6- glicerol, 7- ácido fórmico, 8- ácido acético..	57
Figura 16 - Curvas de calibração externa obtidas para os padrões analíticos utilizando as áreas dos picos.	58
Figura 17 - Curvas de calibração externa obtidas para os padrões analíticos utilizando as alturas dos picos.....	59
Figura 18 - Produtos obtidos na reação teste de oxidação do glicerol (1- gliceraldeído, 2- ácido glicólico, 3- ácido láctico, 4- glicerol e 5- ácido fórmico).	70
Figura 19 - Cromatograma obtido para a análise de glicerol a 25000 µg mL ⁻¹ sem derivatização, 1 –piridina, 2 – glicerol sem derivatizar.	74
Figura 20 - Cromatograma obtido para o glicerol derivatizado com com MSTFA.	75
Figura 21 - Cromatograma obtido na análise do glicerol derivatizado com MSTFA..	76
Figura 22 - Espectro de íons obtidos para a identificação do glicerol derivatizado com MSTFA, Biblioteca NIST 08-2008.....	76
Figura 23 - Glicerol derivatizado com MSTFA (1 –solventes, 2 –glicerol derivatizado).....	77
Figura 24 - Cromatogramas obtidos com as variações de fluxo da fase móvel.	78
Figura 25 - Cromatograma obtido na derivatização do gliceraldeído com MSTFA. ..	79

Figura 26 - Cromatograma obtido na injeção dos padrões analíticos 1- ácido láctico, 2 gliceraldeído + ácido glicólico, 3- ácido oxálico, 4- dihidroxiacetona, 5- glicerol, 6- ácido láctico.	79
Figura 27 - Cromatograma obtido na derivatização do ácido acético e ácido fórmico.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos relatados na literatura científica que fazem uso da técnica de HPLC para identificar os possíveis produtos da reação de oxidação do glicerol.	27
Tabela 2 - Coeficientes de variação em função da concentração do analito.	31
Tabela 3 - Recuperação do analito em função da concentração.	33
Tabela 4 - Principais parâmetros cromatográficos observados nos trabalhos desenvolvidos.	35
Tabela 5: Padrões analíticos utilizados no desenvolvimento dos métodos cromatográficos.	42
Tabela 6 - Resolução dos compostos com variação do pH.	52
Tabela 7 - Resoluções obtidas para os compostos com a variação do fluxo da fase móvel.	53
Tabela 8 - Resoluções obtidas para os compostos com a variação da temperatura da coluna.	54
Tabela 9 - Resoluções obtidas com a variação da temperatura do detector.	55
Tabela 10 - Tempo de retenção dos padrões.	56
Tabela 11 - Intervalo linear obtido das curvas de calibração.	60
Tabela 12 - Coeficientes de correlação e equação da reta da curva analítica.	61
Tabela 13 - Limite de detecção e limite de quantificação.	62
Tabela 14 - Precisão instrumental.	63
Tabela 15 - Repetitividade.	64
Tabela 16 - Determinação da precisão intermediária.	65
Tabela 17 - Comparativo entre analistas na determinação da precisão intermediária.	65
Tabela 18 - Erros adotados para as medidas realizadas.	66
Tabela 19 - Exatidão do método proposto considerando a área do pico para amostra real.	67

Tabela 20 - Exatidão do método proposto considerando a altura do pico para amostra real.	67
Tabela 21 - Recuperação com matriz isenta de padrões.	68
Tabela 22 - Resultado dos testes de robustez.	69
Tabela 23 - Comparação entre os métodos relatados na literatura científica e o método proposto neste trabalho.	72
Tabela 24 - Condições cromatográficas utilizadas na metodologia baseada em cromatografia gasosa.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitros
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo
EURACHEM	<i>European Collaboration in Analytical Chemistry</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC/MS	Cromatografia Gasosa- espectrometria de massas, do inglês <i>Gas Chromatography-mass spectrometry</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid</i>
INMETRO-DOQ- CGCRE 008	Orientação sobre validação de métodos analíticos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IR	Índice de Refração
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
m/z	Razão massa carga
MSTFA	N-metil-N- (trimetilsilil)trifluoroacetamida
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
Pd	Paládio
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppb	Partes por bilhão
Ppm	Partes por milhão
Pt	Platina
PVDF	Poli (Fluoreto de vinilideno)
Rs	Resolução

SPME

Microextração em fase sólida

TMCS

Trimetilclorosilano

UV

Espectroscopia Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Geral	18
2.2	Específicos	18
3.1	Glicerol	19
3.2	Oxidação catalítica do glicerol	21
3.3	Produtos da reação de oxidação do glicerol	23
3.4	Métodos analíticos para a determinação dos produtos da reação de oxidação do glicerol	25
3.4.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	25
3.5	Desenvolvimento e validação de métodos analíticos	29
3.5.1	Seletividade	29
3.5.2	Linearidade e faixa linear	30
3.5.3	Precisão	30
3.5.3.1	Repetitividade	31
3.5.3.2	Precisão intermediária	32
3.5.3.3	Precisão instrumental	32
3.5.4	Exatidão	32
3.5.5	Robustez	33
3.5.6	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	34
3.6	Métodos analíticos relatados e validados	35
3.7	Cromatografia Gasosa	38
3.8	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Equipamentos	41

4.2	Solventes e padrões analíticos	42
4.3	Desenvolvimento do método para identificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por HPLC	43
4.3.1	Preparo da fase móvel	44
4.3.2	Parâmetros de separação	44
4.3.3	Parâmetros de validação	46
4.4	Desenvolvimento do método para identificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por GC	46
4.4.1	Parâmetros de separação	46
4.4.2	Preparo dos padrões para injeção em GC	47
4.4.3	Otimização da reação de derivatização	47
4.5	Reação de oxidação do glicerol	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1.	Otimização da metodologia analítica utilizando HPLC	49
5.1.1	Otimização do pH da fase móvel	50
5.1.2	Otimização do fluxo da fase móvel	52
5.1.3	Otimização da temperatura da coluna	53
5.1.4	Otimização da temperatura do detector	55
5.2.	Metodologia desenvolvida por HPLC	55
5.3	Validação do método de HPLC	56
5.3.1	Seletividade	56
5.3.2	Curva de calibração externa	57
5.3.3	Linearidade	60
5.3.4	Limite de detecção e limite de quantificação	61
5.3.5	Precisão	62
5.3.5.1	Precisão instrumental	62
5.3.5.2	Repetitividade	63
5.3.5.3	Precisão intermediária	64

5.3.6 Exatidão	66
5.3.7 Robustez	69
5.4. Aplicação da metodologia proposta.....	70
5.5. Comparação das metodologias	71
5.6. Desenvolvimento da metodologia analítica baseada em cromatografia gasosa	73
5.6.1 Otimização da reação de derivatização	74
5.6.2 Otimização do fluxo da fase móvel	77
5.6.3 Determinação dos tempos de retenção dos analitos derivatizados	78
6 CONCLUSÃO.....	82
7 PERSPECTIVAS	83
REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia renováveis vem ganhando espaço no cenário mundial uma vez que estas energias são consideradas ecologicamente corretas e proporcionam uma ampla aplicação. Um exemplo da produção deste tipo de energia é a conversão de óleos, gorduras vegetais e animais, através de reações químicas para a obtenção de biodiesel. Porém, durante o processo reacional ocorre a produção de subprodutos, como é o caso do glicerol, obtido na reação de transesterificação de óleos, gorduras vegetais e animais. Estima-se que na reação para obtenção de biodiesel, 10% do produto gerado é glicerol (ZHOU et al., 2008). Nesse contexto, o glicerol é utilizado em pesquisas para obtenção de diversos produtos.

Uma das aplicações do glicerol é a reação de oxidação através do uso de catalisadores e condições reacionais, onde é possível obter diferentes produtos (ácido tartrônico, ácido oxálico, gliceraldeído, ácido glicólico, ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico) resultantes de alterações no sistema catalítico, como pressão, temperatura, pH do meio reacional e tipo de catalisador (UMPIERRE e MACHADO, 2012).

Para a identificação dos produtos formados é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos. Após o desenvolvimento, estes métodos passam por um processo de validação, o qual determina o desempenho dos mesmos, partindo da avaliação de parâmetros como exatidão, precisão, seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, baseado em normas como, por exemplo, INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Orientação sobre validação de métodos analíticos) (2011) e EURACHEM (European Collaboration in Analytical) (2014).

Uma das técnicas analíticas utilizadas para a separação e identificação dos produtos de uma reação é a cromatografia, que abrange HPLC e GC, ambas utilizadas por possuírem dispositivos que promovem a separação, identificação e a quantificação dos analitos presentes em uma amostra. Com esta técnica, cromatografia, são desenvolvidos métodos com um tempo de análise reduzido, alta resolução, boa análise qualitativa, boa detectabilidade, resultados quantitativos de grande e de ampla aplicação na área de análises químicas.

Na literatura são encontrados relatos do uso da técnica de HPLC para a identificação e quantificação dos produtos de oxidação do glicerol desde 1993 (KIMURA e TSUTO, 1993), porém apenas dois trabalhos relatam o método cromatográfico em si e a sua validação para este fim (CHEN et al., 2007 e BÉLTRAN-PRIETO et al., 2013). Não são encontrados métodos na literatura para a identificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol utilizando cromatografia gasosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologias analíticas para a identificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol pelas técnicas de HPLC e GC.

2.2 Específicos

- Desenvolver um método de identificação, separação e quantificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por HPLC;
- Estudar parâmetros cromatográficos e suas influências no desenvolvimento de um método de forma univariada;
- Aplicar ensaios relativos a validação de métodos como exatidão, precisão, seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção, quantificação, robustez, de acordo com normas vigentes;
- Desenvolver um método preliminar de identificação, separação e quantificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por GC.

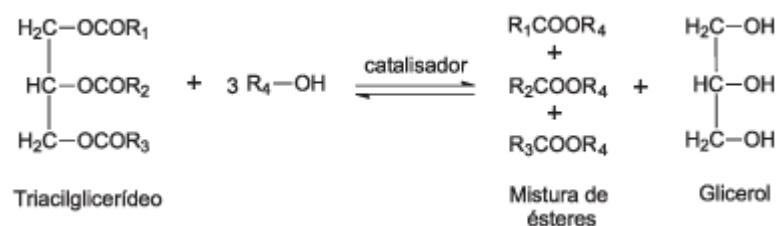
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Glicerol

O uso de matérias primas renováveis pela indústria vem ganhando espaço no cenário econômico mundial. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com intuito de substituir as tecnologias existentes por tecnologias mais limpas, ou seja, mais sustentáveis, como é o caso dos biocombustíveis. Neste contexto, um dos combustíveis renováveis mais promissores é o biodiesel, que pode ser obtido através de diferentes reações, como craqueamento, esterificação e transesterificação (RAMOS et al., 2011).

A reação mais utilizada é a reação de transesterificação, que é uma reação de triacilglicerídeos com um álcool de cadeia curta, formando biodiesel (ésteres metílicos) e glicerol (DÍAZ-ÁLVAREZ e CADIerno, 2013; KING e WRIGHT, 2007), de acordo com a reação representada na Figura 1.

Figura 1 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos. Onde: R₁, R₂, R₃ e R₄ representam grupos alquila.



Fonte: Autor (2016) - Adaptado de PINTO et al., (2005).

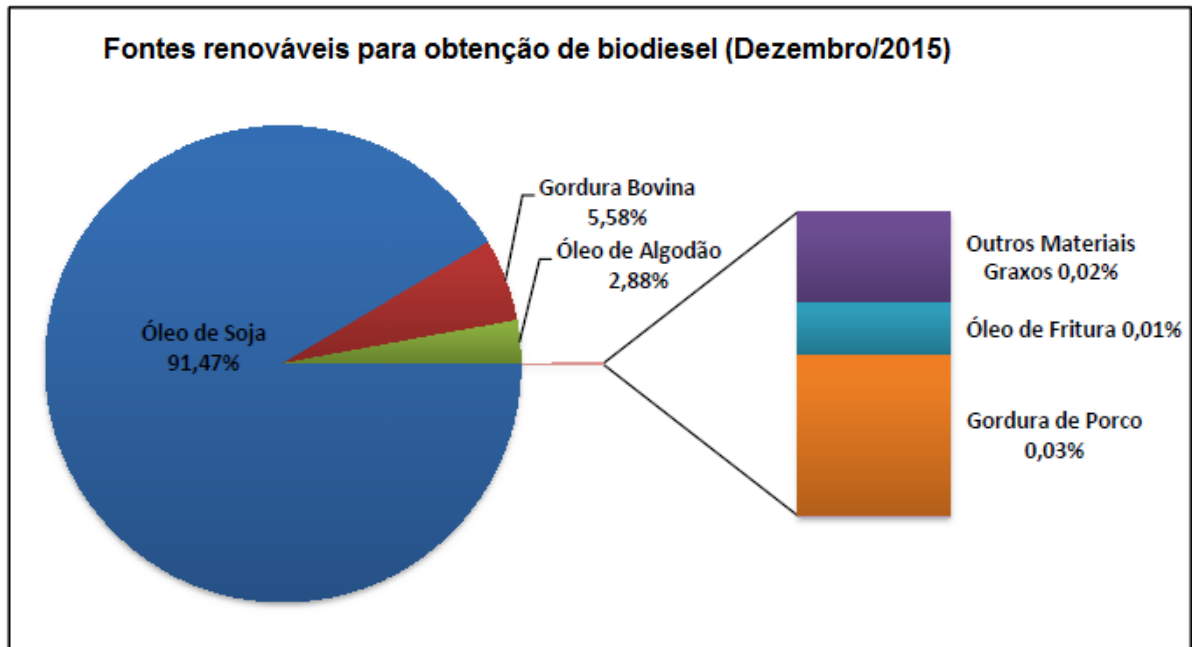
A obtenção do biodiesel é diversificada através da produção de oleaginosas, que por sua vez, são originadas de fontes renováveis, das quais podemos citar mamona, soja, dendê, girassol, amendoim (PINTO et al., 2005), além de sebo bovino (SUAREZ et al., 2007).

Durante o processo de obtenção do biodiesel através da reação de transesterificação ocorre a produção do glicerol (Figura 1). Ou seja, para cada 3

mols de ésteres metílicos é gerado 1 mol de glicerol que equivale a 10% da massa total produzida durante o processo industrial (ZHOU et al., 2008).

Segundo os dados do boletim da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), a produção média mensal de biodiesel variou de 300 mil a 400 mil m³ até janeiro de 2016. Ou seja, foram gerados em torno de 30 a 40 mil m³ de glicerol. Ainda de acordo com a ANP, as fontes renováveis mais utilizadas para obtenção do biodiesel em janeiro de 2016 estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Fontes renováveis para obtenção de biodiesel.



Fonte: Autor (2016) - Adaptado de ANP, (2016).

Quimicamente, o glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos e possui o nome de 1,2,3-propanotriol possuindo a seguinte caracterização química: líquido incolor, com gosto adocicado, sem odor e muito viscoso (BEATRIZ et al., 2011) e popularmente é conhecido pelo nome de glicerina.

Os três grupos hidroxilas presentes na estrutura do glicerol são responsáveis pela sua solubilidade em água e também pela sua natureza higroscópica. O glicerol é uma molécula altamente flexível, formando ligações de hidrogênio inter e intramoleculares responsáveis pela sua funcionalização (BEATRIZ et al., 2011).

Devido à funcionalização da molécula do glicerol, vários estudos têm sido realizados buscando novos produtos químicos para o mercado. Na obtenção destes produtos a partir de reações com o glicerol destacam-se processos catalíticos que utilizam reações de oxidação seletiva, eterificação, hidrogenólise, desidratação, fermentação, esterificação, dentre outras (PAGLIARO et al., 2007).

O glicerol possui uma ampla aplicação industrial, no entanto, essa demanda ainda é considerada pequena em relação à produção total de glicerol obtida nas indústrias de biodiesel. O glicerol pode ser aplicado na indústria química, têxtil, indústria de plásticos, polímeros, explosivos, alimentos, alimentação animal, geração de energia e na área de biotecnologia para síntese de compostos de interesse (AYOUB e ABDULLAH, 2012 e LEONETI et al., 2012).

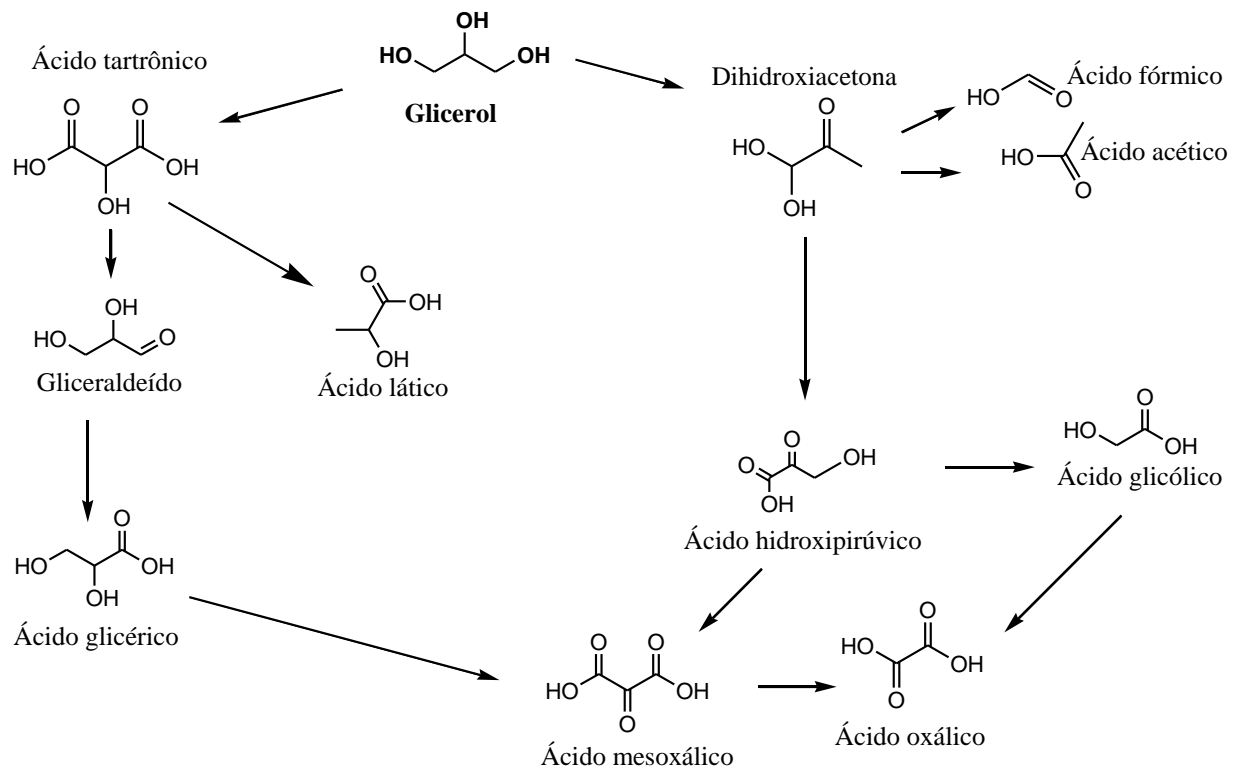
3.2 Oxidação catalítica do glicerol

Pela rota de oxidação catalítica do glicerol é possível obter uma gama de produtos, através do uso de diferentes catalisadores e condições reacionais, sendo possível sua orientação com intuito de obter seletividade a diferentes produtos de interesse que tenham valor econômico maior que o glicerol.

Os catalisadores mais utilizados de acordo com dados da literatura são os catalisadores de Pd (paládio) e Pt (platina), pois são os mais ativos para oxidação de álcoois (KOROVCHENKO et al., 2007; SHELDON, 2014), porém a seletividade ainda é um desafio a ser estudado criteriosamente juntamente com outros parâmetros reacionais.

Um exemplo dos produtos que podem ser obtidos na reação de oxidação do glicerol utilizando Pt como catalisador estão apresentados na Figura 3:

Figura 3 - Rota de oxidação do glicerol com catalisadores de platina.



Fonte: Autor (2016) - Adaptado de UMPIERRE e MACHADO 2012; SHEN et al., 2015 e FENG et al., 2015.

Nesta rota, a oxidação dos álcoois primários do glicerol conduz à formação de ácido glicérico e ácido tartrônico, sendo o gliceraldeído um produto intermediário gerado no processo de oxidação do glicerol à ácido glicérico. A oxidação dos álcoois secundários leva à produção de dihidroxiacetona, e a oxidação das funções primárias da dihidroxiacetona conduz à formação dos ácidos hidroxipirúvico e ácido mesoxálico, ambas moléculas que apresentam uma alta funcionalização. A superoxidação do glicerol nesta rota leva à produção de ácido oxálico e ácido glicólico. A obtenção de produtos como ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico é relatada em diferentes estudos com variados tipos de catalisadores e condições reacionais (SHEN et al., 2015; FENG et al., 2015).

Na reação de oxidação do glicerol são utilizados diferentes tipos de catalisadores dispersos em solução aquosa de glicerol em presença de oxigênio molecular com uma variação de temperatura na faixa de 50 até 100 °C. Os catalisadores utilizados para a reação de oxidação são catalisadores heterogêneos

que podem ser preparados por métodos convencionais de coprecipitação e impregnação (UMPIERRE e MACHADO, 2012).

O oxigênio molecular utilizado no processo da reação de oxidação do glicerol é responsável pela oxidação dos carbonos da cadeia, porém pode conduzir a oxidação dos catalisadores de Pd e Pt levando-os a sua desativação, sendo a sua concentração no processo rigorosamente controlada. Outro fator importante na reação de oxidação é o pH, que possui forte influência da seletividade catalítica, especialmente com catalisadores a base de Pd, onde a oxidação dos álcoois primários é favorecida em meio alcalino e a oxidação do álcool secundário é favorecida em meio ácido (UMPIERRE e MACHADO, 2012).

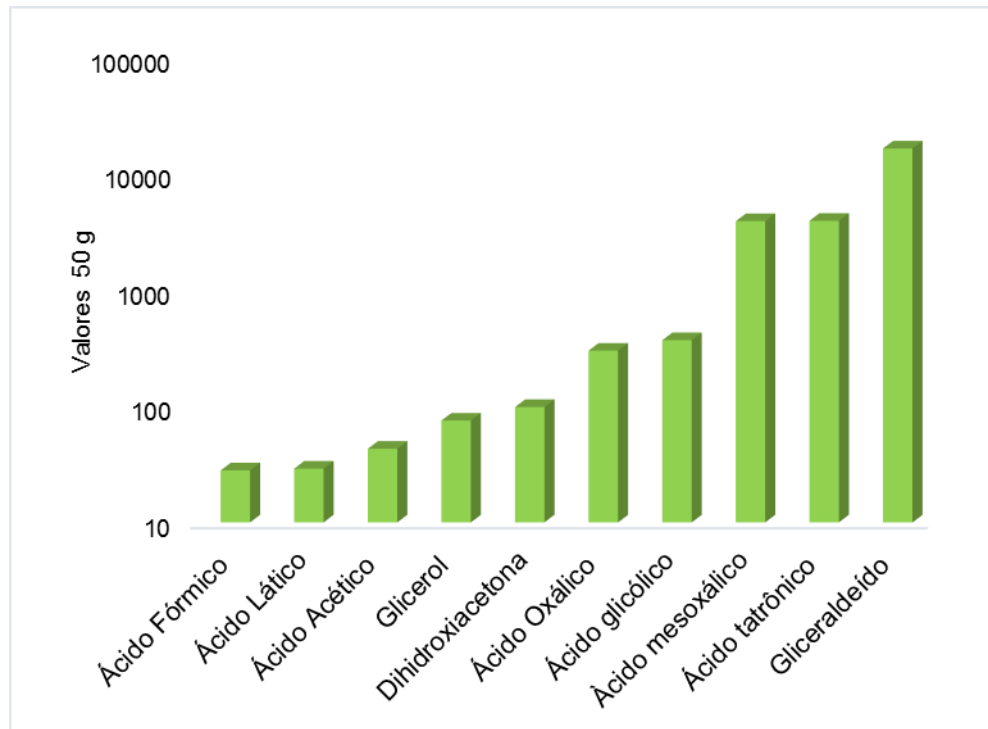
3.3 Produtos da reação de oxidação do glicerol

Os produtos obtidos na reação de oxidação do glicerol possuem uma ampla aplicação nas mais diferentes áreas industriais (química, farmacêutica, cosméticos, petroquímica entre outras), estes produtos possuem um valor econômico diferenciado devido a diversas aplicações. A Figura 4 mostra um comparativo do valor de cada produto que pode ser obtido na reação de oxidação do glicerol.

O gliceraldeído, um dos produtos de maior valor no mercado, tem grande importância, pois é um intermediário do metabolismo de carboidratos (MOTA e PESTANA, 2011). O ácido tartrônico, além de ser um dos produtos de maior valor no mercado de insumos químicos, é também utilizado como agente farmacêutico agente de proteção anticorrosiva, bem como monômero para obtenção de biopolímeros (CAI et al., 2014).

O ácido mesoxálico, assim como o glicerol, apresenta uma boa funcionalidade, por isso tem sido aplicado como agente complexante em síntese orgânica e estudos recentes apresentam sua atividade contra HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (ZHENG et al., 2008). O ácido glicólico possui amplas aplicações na indústria do couro, indústria de petróleo e gás, indústria têxtil, lavandarias e produtos para cuidados pessoais (KATAOKA et al., 2001).

Figura 4 - Valor em R\$ dos principais produtos da reação de oxidação do glicerol com base da cotação na Sigma-Aldrich em setembro de 2015.



Fonte: Autor, (2016).

O ácido oxálico possui aplicação na indústria têxtil como branqueador de fibras, agente neutralizante nos processos de tingimento, sendo também empregado na indústria química na formulação de removedores de ferrugens e manchas de tinta, de polidores de metais, limpadores de radiadores e outros sistemas de resfriamento à base de água (KIRK e OTHEMER, 1952 *apud* CAVALHEIRO et al., 2000).

A dihidroxiacetona é um dos produtos utilizados na indústria cosmética para fabricação de bronzeadores e também para produção de polímeros (MOTA et al., 2009) além de dar origem a produtos da química fina, como 1,2 propileno e ácido láctico (HEKMAT et al., 2003; BICKER et al., 2005).

O ácido acético, fórmico e láctico além de serem utilizados na indústria de alimentos (FENG et al., 2014) podem ser utilizados como insumos químicos para reações e análises químicas. O ácido láctico pode ser aplicado como solvente e também na obtenção de plásticos biodegradáveis, e é uns dos promissores para a

síntese catalítica de uma vasta gama de produtos químicos de base biológica (DUSSELIER et al., 2013; MAKI-ARVELA et al., 2014).

3.4 Métodos analíticos para a determinação dos produtos da reação de oxidação do glicerol

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica de HPLC é uma técnica de separação, identificação e quantificação que possui ampla aplicação, pois possui um tempo de análise reduzido, alta resolução, boa análise qualitativa, boa detectabilidade, apresenta resultados quantitativos com precisão. Esta é uma técnica que pode ser aplicada na determinação de corantes sintéticos (ANDRADE et al., 2014), arsênio em alimentos (RABER et al., 2012), determinação de traços de metais (HU et al., 2002), determinação de compostos orgânicos na urina (AHMADI-JOUIBARIA e SHAMSIPURC, 2014), entre outras.

Esta técnica é composta por um sistema de alta pressão onde a fase móvel (líquido) é bombeada através de uma coluna cromatográfica responsável pela separação dos compostos. Os compostos são separados de acordo com sua interação entre fase móvel e a fase estacionária, e posteriormente são identificados sob a forma de picos através de detectores específicos, gerando um conjunto de sinais denominado cromatograma.

Um dos princípios da cromatografia líquida baseia-se na cromatografia de troca iônica, que pode ser aplicada para análise de substâncias ionizáveis através do mecanismo de interação eletrostática reversível entre os íons na fase móvel (eluente e amostra) e os centros imobilizados na fase estacionária (LANÇAS, 2009).

O detector de índice de refração (IR) é um dos detectores mais utilizados em cromatografia líquida, considerado um detector universal, com grande sensibilidade a variações de temperatura e pressão sendo necessário que as análises sejam realizadas em modo isocrático (HARRIS, 2008).

A literatura científica dispõe de diversos trabalhos que relatam a reação de oxidação do glicerol e a identificação dos possíveis produtos desta reação através da técnica de HPLC (KIMURA (1992); GARCIA et al., 1995; DAN et al., 2012).

Os outros trabalhos propostos possuem como foco principal o desenvolvimento de catalisadores (homogêneos/heterogêneos) para a reação de oxidação do glicerol, bem como as condições reacionais adotadas na rota catalítica (pH, temperatura, tipo de reator, agente oxidante), não abrangendo de uma forma mais ampla o desenvolvimento e a validação do método analítico para a identificação e quantificação destes produtos (PORTA e PRATI, 2004; MENGYUAN et al., 2012; LEE et al., 2014).

Dos trabalhos relatados com ênfase no desenvolvimento de catalisadores é possível obter alguns dados como o tipo de fase móvel, coluna, temperatura e detectores utilizados, abordando também os produtos identificados na reação. Estes estudos têm sido relatados desde 1993 (KIMURA e TSUTO) e atualmente a técnica de HPLC é uma das mais utilizadas, conforme mostra a Tabela 1.

De acordo com os dados relatados na Tabela 1, H_3PO_4 e H_2SO_4 são as fases móveis mais utilizadas para identificação destes produtos, bem como colunas do tipo Alltech AO 1000, Aminex, que são colunas que apresentam a fase estacionária composta por poliestireno divinilbenzeno sulfonado, caracterizando os processos cromatográficos como um processo de troca catiônica. Os produtos da rota de oxidação do glicerol identificados variaram de acordo com a seletividade na qual os trabalhos foram desenvolvidos.

Tabela 1 - Trabalhos relatados na literatura científica que fazem uso da técnica de HPLC para identificar os possíveis produtos da reação de oxidação do glicerol.

Coluna utilizada	Fase móvel (mol L ⁻¹)	Detector	Produtos identificados	Referências
C-610S -	Água	IR	Ácido glicérico, ácido hidroxipirúvico, glicerol, gliceraldeído, dihidroxiacetona.	KIMURA e TSUTO, 1993
Aminex HPX-87H Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0,004M	UV-IR	Gliceraldeído, ácido glicérico, ácido tartrônico, ácido fórmico, ácido glicólico, ácido oxálico.	ROQUET et al., 1994
Alltech OA1000 Troca iônica	-	UV-IR	Ácido glicérico, gliceraldeído, ácido hidroxipirúvico, dihidroxiacetona, ácido tartrônico, ácido oxálico.	GARCIA et al., 1995
Alltech OA-1000 Troca iônica	H ₃ PO ₄ 0,1M	UV-IR	Glicerol, ácido glicérico, ácido tartrônico, ácido glicólico.	PORTA e PRATI, 2004
Alltech OA1000 Troca iônica	-	UV-IR	Ácido glicérico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido hidroxipirúvico, ácido tartrônico.	DIMITRATOS et al., 2005
Aminex HPX-87H Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0,005 M	IR	Ácido glicérico, ácido glicólico, ácido tartrônico, ácido oxálico, ácido láctico.	KETCHIE et al., 2007
Zorbax SAX Troca iônica	-	IR	Gliceraldeído, dihidroxiacetona, ácido glicólico, ácido glicérico, ácido hidroxipirúvico.	LIANG et al., 2009
IC Pak Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0.0004 M	UV-IR	Ácido glicérico, ácido tartrônico, ácido glicólico, ácido fórmico, ácido oxálico.	MUSIALSKA et al., 2010
MetaCarb H Plus Troca iônica	H ₃ PO ₄ 0,1M	UV	Glicerato, tartronato, oxalato, glicolato formato.	VILLA et al., 2010

Alltech OA 1000 Troca iônica	-	UV-IR	Ácido glicérico, dihidroxiacetona, ácido glicólico, gliceraldeído, ácido tartrônico, ácido oxálico.	RODRIGUES et al., 2011
-	-	UV-IR	Ácido glicérico, dihidroxiacetona, ácido tartrônico, ácido glicólico.	RODRIGUES et al., 2012
Aminex HPX-87H Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0.01 M	UV-IR	Gliceraldeído, ácido glicérico, ácido hidroxipirúvico, ácido tartrônico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido fórmico.	HIRASAWA et al., 2013
Alltech OA-1000 Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0.005 M	-	Ácido glicérico, ácido glicólico, ácido tartrônico, gliceraldeído, ácido oxálico, ácido fórmico.	RODRIGUEZ et al., 2014
Rezex ROA Organic Acid H ⁺ Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0,0025M	IR	Ácido oxálico, ácido tartrônico, ácido glicólico, gliceraldeído, ácido glicérico, ácido fórmico, dihidroxiacetona, ácido hidroxipirúvico.	SKRZYNSKA et al., 2014
Zorbax SAX Troca iônica	-	IR	Ácido glicérico, dihidroxiacetona, ácido glicólico, gliceraldeído.	ZHANG et al., 2015
Aminex HPX-87H Troca iônica	H ₂ SO ₄ 0.025 M	UV-IR	Ácido oxálico, ácido tartrônico, ácido glicólico, gliceraldeído, dihidroxiacetona, ácido glicérico	NING et al., 2016

Fonte: Autor, (2016). Onde (-) representa dados não relatados.

3.5 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

Ao desenvolver um novo método analítico é preciso assegurar que todo o sistema em estudo forneça resultados com precisão e exatidão aceitáveis, através de ensaios analíticos que comprovem a eficiência deste método. O bom desempenho das técnicas analíticas depende de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos (RIBEIRO et al., 2008).

De acordo com o INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011) e a EURACHEM (2014), a validação é um instrumento pelo qual é comprovado, através de evidências objetivas, que os requisitos necessários para uma aplicação ou uso específico foram atendidos. Os parâmetros mais utilizados no desenvolvimento de métodos cromatográficos são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e também figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros a seguir foram avaliados de acordo com critérios estabelecidos para cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa. Nesse sentido, a área do pico cromatográfico é um parâmetro quantitativo fundamental para análise destes parâmetros. A altura dos picos também pode ser relacionada na avaliação destes dados, caso ocorra pequenas coeluições.

3.5.1 Seletividade

A seletividade de um método depende do quanto a metodologia é indiferente à presença de interferentes da matriz na determinação do analito (ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009). Este parâmetro avalia o grau de interferência de outras espécies como outro ingrediente ativo, impurezas e produtos de degradação, assim como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes. Em cromatografia, este tem como objetivo garantir que o pico obtido relacionado a resposta analítica seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004; INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011), EURACHEM, 2014). A seletividade

poder ser avaliada através da matriz reacional isenta dos analitos de interesse comparada com a matriz fortificada por padrões analíticos.

3.5.2 Linearidade e faixa linear

A linearidade dos métodos analíticos quantitativos é medida pela capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009). Este parâmetro pode ser determinado a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, obtido por uma equação da reta ($y=ax + b$), chamada de curva analítica. Os coeficientes **a** e **b** da curva analítica podem ser estimados através de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear, onde pode ser calculado também o coeficiente de correlação (r), um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). O INMETRO (DOQ-CGCRE-008, 2011) recomenda um valor de coeficiente de correlação acima de 0,90.

Em uma técnica instrumental a relação linear descrita pela equação $y=ax + b$, só é válida para um determinado intervalo de massa ou concentração do analito medido que também pode ser denominado faixa linear dinâmica.

A faixa linear de um método analítico corresponde ao intervalo de concentração de analito em que a resposta é proporcional a concentração (HARRIS, 2008).

3.5.3 Precisão

De acordo com as normas do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011) e EURACHEM (2014), a precisão pode ser determinada através da avaliação de

parâmetros como repetitividade e precisão intermediária, sendo expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR). De acordo com WOOD (1999) o CV está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra. A Tabela 2 mostra os níveis aceitos para cada concentração em estudo.

Tabela 2 - Coeficientes de variação em função da concentração do analito.

Concentração do analito (%)	Coeficiente de Variação (%)
1 (100%)	2,0
10^{-1}	2,8
10^{-2} (1%)	4,0
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8,0
10^{-5}	11,0
10^{-6} (ppm)	16,0
10^{-7}	23,0
10^{-8}	32,0
10^{-9} (ppb)	45,0

Fonte: Autor (2016) - Adaptado de WOOD, (1999).

3.5.3.1 Repetitividade

A repetitividade é definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuada sob as mesmas condições de medição (ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009). Este parâmetro envolve várias medições da mesma amostra em diferentes preparações, sendo denominado algumas vezes por precisão intra-ensaio podendo ser expressa através da estimativa do DPR (RIBANI et al., 2004), onde o recomendado pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011) são sete ou mais repetições para o cálculo.

3.5.3.2 Precisão intermediária

O parâmetro precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório em diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados dentro de um laboratório. Este ensaio tem como objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004; INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011)).

3.5.3.3 Precisão instrumental

A precisão instrumental é realizada efetuando medidas repetitivas da mesma amostra sequencialmente no mesmo instrumento, no mesmo dia, pelo mesmo analista (10 vezes), seguido pela média dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções realizadas (RIBANI et al., 2004;).

3.5.4 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro de mensurando. Este ensaio traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro. O ensaio de recuperação é um dos processos mais utilizados na avaliação da exatidão. A recuperação é definida como a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada na proporção analítica do material teste, que pode ser extraída ou quantificada (RIBANI et al., 2004). De acordo com BRITO et al. (2003), os valores estimados de recuperação estão representados na Tabela 3 e são baseados em dados obtidos no Manual de métodos oficiais de análises.

Tabela 3 - Recuperação do analito em função da concentração.

Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
≥ 10	98 – 102
≥ 1	97 – 103
≥ 0,1	95 – 105
≥ 0,01	90 – 107
≥ 0,001 ≥0,00001	80 – 110
≥ 0,000001	60 – 115
≥0,0000001	40 – 120

Fonte: Autor (2016) - Adaptado de BRITO et al., (2003).

De acordo com o INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011) a recuperação pode ser calculada pela fórmula:

$$\text{Recuperação} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Onde: C_1 é a concentração determinada na amostra concentrada, C_2 concentração determinada na amostra não adicionada e C_3 é a concentração adicionada.

3.5.5 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações de seus valores otimizados. O método é considerado robusto quando o mesmo não é afetado por pequenas alterações em seu sistema (INMETRO, DOQ-CGCRE-008 (2011)). Em cromatografia, a robustez pode ser avaliada através da variação de parâmetros como temperatura da coluna ± 5 °C, ou até mesmo mudança do pH da fase móvel (HPLC). Se com essas alterações os resultados obtidos ainda estiverem de acordo com os limites (aceitáveis) de

exatidão, precisão e seletividade, o método é robusto e essas alterações podem ser incorporadas no procedimento (ARAGÃO et al., 2009).

3.5.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental proposta enquanto o limite de quantificação (LQ) é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método (RIBEIRO et al., 2008).

Uma das formas de determinação do LD e do LQ é através do método baseado em dados obtidos na curva analítica, sendo este um método que apresenta maior confiabilidade estatística, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. Neste método o LD pode ser expresso conforme a equação:

$$LD= 3,3 \times s/S$$

Na determinação do LQ os mesmos critérios adotados para o LD podem ser aplicados utilizando a relação 10:1 conforme a equação:

$$LQ= 10 \times s/S$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é a inclinação, ou coeficiente angular da curva analítica.

Os parâmetros necessários para aplicações destes cálculos podem ser obtidos através de Softwares como Origin[®] (RIBANI et al., 2004).

Para avaliação dos parâmetros de validação do método proposto foram consideradas a área e a altura dos picos obtidos nas análises cromatográficas para fins de comparação dos resultados.

3.6 Métodos analíticos relatados e validados

Dos trabalhos relatados na literatura sobre identificação, quantificação e separação dos produtos de oxidação do glicerol, foram encontrados apenas dois que validaram a metodologia analítica proposta por HPLC (CHEN et al., 2007; BÉLTRAN-PRIETO et al., 2013). Alguns dados relevantes e parâmetros cromatográficos utilizados no desenvolvimento dos métodos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Principais parâmetros cromatográficos observados nos trabalhos desenvolvidos.

PARÂMETROS	CHEN et al., 2007	BÉLTRAN-PRIETO et al., 2013
<i>Coluna utilizada</i>	Aminex HPX-87H	Aminex HPX-87C
<i>Fase móvel</i>	H ₂ SO ₄ / Acetonitrila	H ₂ SO ₄
<i>Taxa de fluxo</i>	0,5 mL min ⁻¹	0,5 mL min ⁻¹
<i>Faixa de concentração</i>	0,06 – 15 mg mL ⁻¹	0,5 – 10 mg mL ⁻¹
<i>Produtos de interesse</i>	04	07
<i>Tempo de análise</i>	25 min	25 min
<i>Temperatura Coluna</i>	25 °C	70 °C
<i>Detector</i>	IR	IR/UV
<i>Principais problemas</i>	Preparo da amostra	Coeluição
<i>Faixa de trabalho</i>	40- 15000 µg mL ⁻¹	1000 -10000 µg mL ⁻¹

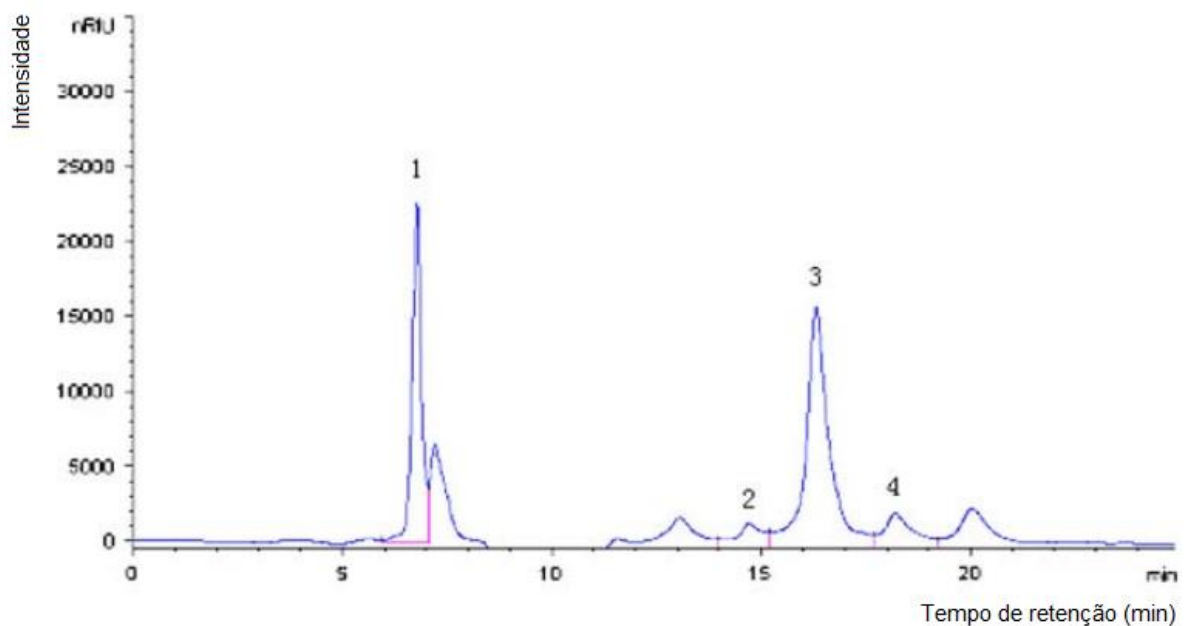
Fonte: Autor (2016) - Adaptado de CHEN et al., 2007; BÉLTRAN-PRIETO et al., (2013).

Dos 04 padrões analíticos utilizados para validar a metodologia de CHEN et al. (2007) (glicerol, dihidroxiacetona (DHA), 1,3-propanediol (1,3-PD) e 3-hidróxi-propanaldeído (3-HPA)), apenas dois são produtos da rota de interesse da oxidação do glicerol (glicerol e dihidroxiacetona). Estes produtos foram obtidos através de um processo de fermentação do glicerol com microrganismos com condições reacionais controladas (pH, temperatura). Foi adicionada acetonitrila a fase móvel (H₂SO₄) com intuito de promover a separação dos picos de glicerol e dihidroxiacetona. Porém nos

últimos anos tem se estudado a substituição de acetonitrila por outros solventes em função de sua escassez e disponibilidade no mercado internacional, bem como seu alto custo (HÄRTER et al., 2014) e a sua substituição por solventes ambiental e toxicologicamente corretos, como é o caso do uso de fluidos no estado supercrítico em cromatografia (LANÇAS, 2009) ou o uso de outros solventes como H_3PO_4 ou H_2SO_4 para fase móvel. Portanto neste método o uso de acetonitrila neste método é visto como um fator negativo, causando desvantagem a este método.

A Figura 05 mostra o cromatograma obtido para a análise de uma amostra da reação enzimática no método proposto por CHEN et al. (2007).

Figura 5 - Cromatograma obtido na análise da amostra de uma reação enzimática 1 (3-hidróxi-propanaldeído), 2 (dihidroxiacetona) 3 (glicerol) 4 (1,3-propanodiol).

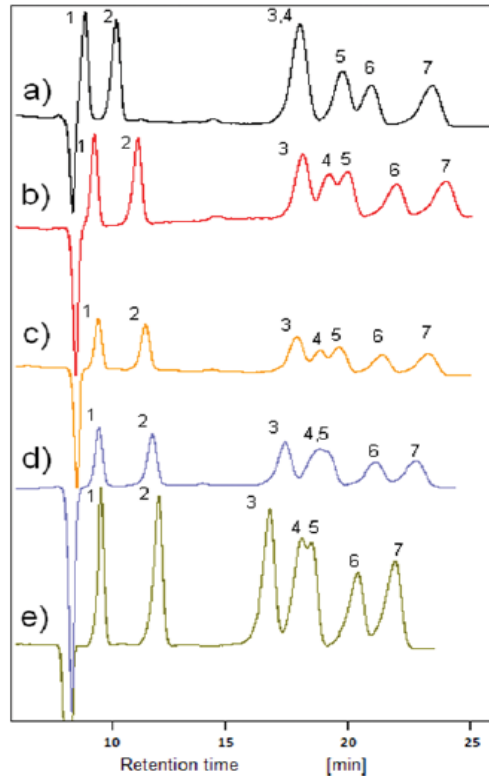


Fonte: Autor (2016) - Adaptado de CHEN et al., (2007).

De acordo com o cromatograma obtido é possível observar a presença de outros compostos (7; 13 e 20 minutos), que podem ser compostos oriundos do preparo de amostra, onde, após a reação enzimática, a amostra foi fervida para a precipitação das enzimas e posteriormente centrifugada, e o sobrenadante foi filtrado e injetado no HPLC. O método proposto foi validado através da execução de ensaios como precisão, linearidade, recuperação e limite de detecção.

No segundo trabalho BELTRÁN-PIETRO et al. (2013) desenvolveram um método analítico onde foi possível identificar 7 produtos da reação de oxidação do glicerol: ácido mesoxálico, ácido tartrônico, gliceraldeído, ácido glicérico, glicerol, ácido glicólico e dihidroxiacetona com tempos de retenção de 9,2; 10,8; 17,2; 18,5; 19,3; 21,4 e 23,0 min, respectivamente, na faixa de trabalho estabelecida de 0,5 -10 mg mL⁻¹. Porém na metodologia proposta pelo autor é possível observar que para o desenvolvimento do método foi utilizada uma fase móvel de concentração 3 mM (H₂SO₄), e, como pode ser observado no cromatograma obtido para esta concentração (Figura 6) a separação dos padrões propostos o método apresenta coeluição (gliceraldeído-3, ácido glicérico-4 e glicerol-5). Pode-se observar também que no estudo da variação para a concentração da fase móvel de 1 a 10 mM H₂SO₄, ocorre sobreposição de pelo menos dois compostos (ácido glicérico-4 e glicerol-5), o que compromete tanto a identificação quanto a quantificação dos compostos de interesse para os quais o método desenvolvido foi proposto, observando-se, assim, que os objetivos do autor foram atingidos parcialmente. Ainda no trabalho proposto por BELTRÁN-PIETRO et al. (2013), que fez uso de dois detectores (UV e IR), quando o detector utilizado foi o detector ultravioleta, não foi possível identificar o composto glicerol, sendo o mesmo o precursor para a obtenção dos produtos de interesse, e ainda assim não é possível afirmar se houve uma conversão total do produto, no caso glicerol, uma vez que o mesmo não é seletivo para este tipo de detector, justificando então o uso dos dois detectores como forma de solucionar os problemas causados pela coeluição dos compostos, uma vez que os compostos que apresentaram coeluição quando o detector utilizado foi o IR foram identificados quando o detector UV foi utilizado.

Figura 6 - Influência da concentração da fase móvel. 1 (ácido mesoxálico), 2(ácido tartrônico), 3 (gliceraldeído), 4(ácido glicérico), 5(glicerol), 6 (ácido glicólico) e 7 (dihidroxiacetona), onde a, b,c,d e e representam as variações 1mM, 2mM, 3mM, 5mM e 10mM respectivamente da concentração da fase móvel.



Fonte: Autor (2016) - Adaptado de: BELTRÁN-PIETRO et al., (2013).

3.7 Cromatografia Gasosa

Na cromatografia gasosa, a amostra é introduzida através de um injetor (aquecido) onde é vaporizada e transferida com o auxílio do gás de arraste para a coluna cromatográfica localizada no forno. Os componentes da amostra são eluídos e conduzidos para o detector localizado na saída da coluna. O detector emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de um cromatograma (PENTEADO et al., 2008).

Alguns parâmetros devem ser avaliados para obter uma boa separação no desenvolvimento de um método cromatográfico. Estes parâmetros são: escolha da coluna para separação de acordo com as características dos compostos, escolha do gás de arraste, detector, temperatura do injetor, estudo sobre rampa de aquecimento

do forno de acordo com a temperatura de ebulição dos analitos, ou seja, rampa de separação ou gradiente de eluição.

A escolha da coluna é um critério fundamental para que a separação dos compostos de interesse ocorra de forma efetiva. O controle da temperatura do injetor é essencial, pois este deve ser aquecido a uma temperatura suficiente para a vaporização total da amostra, porém suficientemente baixa para que não haja decomposição térmica da amostra injetada (COLLINS et al., 2006).

A temperatura de eluição é outro fator importante em cromatografia, pois influencia a separação dos compostos, além do tempo total da análise. Para a determinação dos compostos obtidos na reação de oxidação do glicerol optou-se por trabalhar com um gradiente de temperatura, pois os compostos apresentam diferentes volatilidades.

A volatilidade e a estabilidade térmica são os principais requisitos para que os analitos possam ser analisados por cromatografia gasosa, caso não o sejam, estes devem passar por uma etapa de derivatização, com o objetivo de formar um derivado com volatilidade e estabilidade térmica ideais para análise.

Os compostos formados pela reação de oxidação do glicerol são compostos que apresentam elevada polaridade devido à presença de grupos hidroxilas por isto requerem derivatização, assim como outros compostos que contenham grupos funcionais como carbonila, amino e tiol (SCHUMMER et al., 2009).

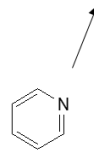
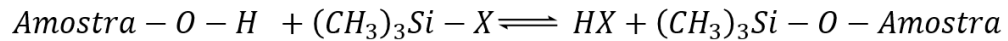
Estes grupos formam ligações de hidrogênio intermoleculares, levando à fraca volatilidade, além de promover interações indesejáveis com a coluna resultando em baixa detectabilidade (HALKET e ZAIKIN, 2009).

A derivatização é feita pela substituição de grupos polares, sendo as reações mais comuns a sililação, alquilação e acilação, sendo a sililação a técnica mais utilizada e alguns dos reagentes mais comuns para este tipo de reação são: Trimetilclorosilano (TMCS), N-Metil- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), N, O-Bis- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (HALKET e ZAIKIN, 2009).

Na reação de sililação os hidrogênios dos álcoois são substituídos pelos grupos alquil silil através do ataque nucleofílico (S_N2) ao agente sililante, com a presença de um bom grupo de saída que melhora o rendimento da reação (SCHUMMER et al., 2009). Nesta reação também é utilizada a piridina, uma base relativamente fraca que reage com os hidrogênios lábeis (reação ácido-base),

atuando como catalisador, facilitando o ataque nucleofílico (S_N2). Esta reação está representada para o glicerol na Figura 7.

Figura 7 - Representação sistemática da reação de derivatização do glicerol com BSTFA. Onde X representa o grupo de saída do agente derivatizante.



Fonte: Autor (2016).

3.8 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

A cromatografia gasosa pode ser acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) pelo fato de suas características serem compatíveis com as exigências de um espectrômetro de massas. A saída da coluna capilar utilizada na GC pode ser colocada diretamente na fonte do espectrômetro de massas e os analitos são convertidos em íons através do impacto de elétrons onde são bombardeados por elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia, desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado e os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com sua razão m/z (massa/carga). O detector apresenta a resposta obtida contra a m/z gerando um espectro de massas correspondente (CHIARADIA et al., 2008; HARRIS, 2008). Os espectros obtidos funcionam como impressões digitais das moléculas e com isto é possível identificar os mesmos com certa similaridade com os espectros contidos na biblioteca do equipamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido ProStar Varian[®] (EUA) modelo 210, bomba isocrática com detector Índice de Refração Varian[®]-356-LC e sistema de injeção manual.
- Cromatógrafo líquido SHIMADZU (Japão) modelo CTO-20A, bomba isocrática com detector índice de refração RID-10A e sistema de injeção manual.
- Cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 da SHIMADZU (Japão), com injetor do tipo Split/Splitless, detector por ionização em chama (FID) injeção manual.
- Cromatógrafo Gasoso Acoplado a espectrômetro de massas modelo GCMS-QP 2010 Plus da SHIMADZU (Japão).
- Balança analítica modelo AX200 SHIMADZU (Japão), com resolução de 0,01 mg até 200 g.
- Sistema de aquecimento composto por chapa de aquecimento modelo 752A da Fisaton (Brasil), com controle de temperatura e agitação.
- Sistema de filtração MilliQ-Plus, Millipore[®] (EUA) composto por cilindro de pressurização, sistema SmartPak DQ3, lâmpada UV (185nm) tanque e sistema com filtro 0,22 µm, garantindo uma resistividade de 18,2 MΩ.
- Sistema Ultrassônico para desgaseificação da fase móvel da marca UNIQUE (Brasil) modelo UltraSonic Cleaner.
- Sistema de filtração a vácuo composto por bomba a vácuo modelo WP611560 da MILLIPORE (EUA).
- Sistema para medição do pH KEM, Potenciometric Automatic Titrator AT-500N (EUA).
- Aparato de filtração de vidro da marca SUPELCO (EUA).
- Agitador de tubos vortex VX-38, Warmnest, Brasil.
- Reator autoclave de 100 mL.

4.2 Solventes e padrões analíticos

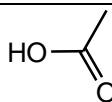
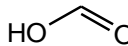
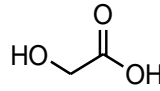
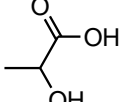
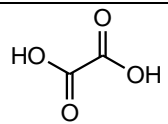
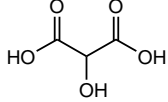
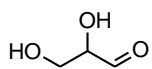
Para a execução dos experimentos utilizando o HPLC foi utilizada água deionizada obtida através do sistema de filtração MilliQ-Plus, Millipore® (EUA). Na descontaminação e limpeza das vidrarias utilizou-se solução de extran da Sigma Aldrich (EUA).

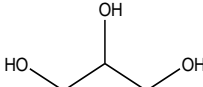
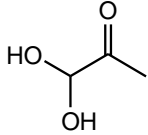
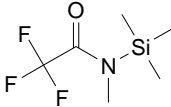
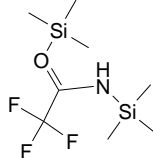
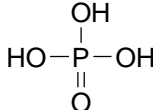

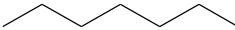
Para o preparo da fase móvel no desenvolvimento do método por HPLC, foi utilizado ácido fosfórico 85% da Vetec (Brasil). Os padrões analíticos e derivatizantes utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos propostos foram obtidos da Sigma-Aldrich e estão relacionados na Tabela 5, com suas purezas e estruturas químicas.

Utilizou-se piridina P.A. da marca Sigma-Aldrich como solvente e catalisador para as reações de derivatização.

No desenvolvimento do método por GC foram utilizados os seguintes gases: ar sintético 99,997%, hidrogênio 99,999%, nitrogênio 99,999% e hélio 99,999%, todos da marca LINDE (Jaboatão, PE-Brasil).

Tabela 5: Padrões analíticos utilizados no desenvolvimento dos métodos cromatográficos.

<i>Reagentes</i>	<i>Pureza</i>	<i>Fórmula estrutural</i>
Ácido acético glacial	99,7%	
Ácido fórmico	85%	
Ácido glicólico	≥98,0 %	
Ácido láctico	≥85,5 %	
Ácido oxálico	≥99,0 %	
Ácido tartrônico	≥97%	
Gliceraldeído	≥90,0 %	

Glicerol	≥99,0 %	
Dihidroxiacetona	≥99,0 %	
N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida	≥98,5%	
N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida	≥98,0 %	
Ácido Fosfórico	≥85,0 %	
Piridina	≥99,0 %	
Heptano	≥99,0 %	

Fonte: Autor (2016).

4.3 Desenvolvimento do método para identificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por HPLC

O desenvolvimento do método por HPLC iniciou-se com o estudo das possíveis rotas de oxidação do glicerol e os diferentes produtos que estas rotas pudessem originar de acordo com a linha de pesquisa desenvolvida no grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

A otimização do método foi iniciada através da avaliação de diferentes parâmetros, como escolha da fase móvel, fluxo, e temperaturas do detector e da

coluna. Todos estes parâmetros foram avaliados de forma a garantir a melhor resolução cromatográfica.

4.3.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada a partir de uma solução concentrada de H_3PO_4 85% onde calculou-se o volume necessário para preparar uma solução de H_3PO_4 10 mM. Com auxílio de uma micropipeta (Agipette, China) de 1000 μL foi transferido 675 μL para um balão volumétrico com capacidade de 1 L contendo 500 mL de água deionizada, o volume foi aferido e a solução foi homogeneizada e posteriormente transferida para um frasco identificado com a data do preparo e responsável pelo preparo. Foi realizado a calibração do pHmetro e em seguida determinado o pH da fase móvel (2,08).

Após o preparo da fase móvel a mesma foi filtrada com um filtro de 0,25 μm de PVDF (difluoreto de polivinilideno) para remoção das partículas e impurezas em um sistema de vácuo, na qual o filtro foi previamente ativado com metanol e em seguida realizada a filtração. Posterior a esta etapa, a fase móvel permaneceu em banho ultrassônico durante 1 hora para remoção das bolhas de ar.

A solução estoque para o preparo da curva analítica no desenvolvimento do método por HPLC foi preparada medindo cerca de 0,020 g de cada um dos padrões analíticos em um balão volumétrico de 5 mL dissolvidos em água deionizada; a solução foi agitada no sistema de agitação vortex até a completa diluição dos padrões. A concentração final da solução estoque foi de 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para otimização das condições cromatográficas foi preparada uma solução de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da solução estoque utilizada nos ensaios.

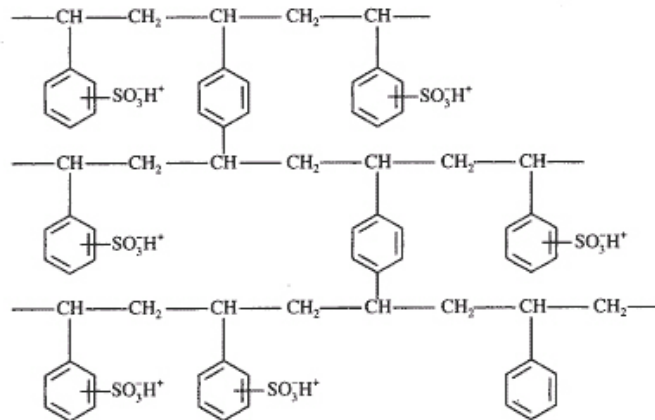
4.3.2 Parâmetros de separação

Na metodologia de HPLC proposta nesta dissertação foi utilizado como detector o IR, considerado um “detector universal”, pois apresenta uma característica física determinada para cada composto e a escolha do solvente com

IR diferente dos compostos a serem analisados possibilita a sua aplicação. Este detector apresenta uma alta sensibilidade quando submetido a variações de temperatura. A identificação dos compostos utilizando este detector é obtida pela diferença do IR da fase móvel com o IR dos compostos de interesse (COLLINS et al., 2006; LANÇAS, 2009).

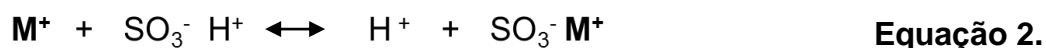
A coluna utilizada no trabalho proposto (Varian® MetaCarb H Plus) é uma coluna que promove a separação e identificação de ácidos orgânicos, ela é composta por ligações cruzadas do copolímero de estireno divinilbenzeno sulfonado contendo o contra-íon H^+ , conforme mostra a Figura 8.

Figura 8 - Estrutura da coluna MetaCarb H PLUS.



Fonte: Autor (2016) - Adaptado de Harris, (2008).

Esta é uma coluna de troca catiônica onde a retenção é baseada na atração eletrostática reversível entre os íons na fase móvel (da amostra e do eluente) e os centros imobilizados de carga oposta presentes na fase estacionária. Este mecanismo pode ser representado pela Equação 2:



Onde M^+ é o cátion ou analito de carga positiva e o H^+ é o contra íon da fase estacionária.

4.3.3 Parâmetros de validação

A seletividade do método foi avaliada através da injeção da matriz da amostra isenta dos padrões de interesse, comparada com uma amostra da matriz fortificada com os padrões em estudo.

A linearidade foi determinada através da construção da curva de calibração externa em concentrações diferentes (mínimo 6) e representadas através da curva analítica. As curvas foram construídas relacionando a área e a altura do pico para fins comparativos.

A precisão foi avaliada através da precisão instrumental onde foi utilizada uma solução contendo os padrões em uma concentração de $27 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta amostra foi injetada 10 vezes para avaliação dos resultados através do desvio padrão e CV.

A repetitividade foi avaliada com a injeção de padrões na concentração de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidas em diferentes preparações. Os resultados obtidos pelas curvas de calibração e posteriormente determinado o desvio padrão e o CV.

A precisão intermediária foi realizada em dia diferente, com outro analista, onde foram preparadas 10 amostras de padrões na concentração de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ e injetadas no HPLC. As concentrações foram obtidas pelas curvas de calibração e posteriormente foram determinados o desvio padrão e o CV para comparação de resultados entre diferentes analistas.

A determinação do LD e do LQ foi realizada por meio da equação que utiliza os valores de estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva.

A avaliação da exatidão foi realizada de duas formas, com uma amostra real de oxidação do glicerol e fortificação desta amostra com posterior recuperação e através da fortificação da matriz isenta e determinação da recuperação.

A robustez do método foi avaliada de acordo com os parâmetros testados no desenvolvimento do método. Foram avaliados pH, temperatura e taxa de fluxo.

4.4 Desenvolvimento do método para identificação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por GC

4.4.1 Parâmetros de separação

Para a análise dos produtos formados durante a reação de oxidação do glicerol em GC utilizou-se uma coluna capilar de 60 metros da OHIO VALLEY OV1 (EUA) com 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 μm . A coluna escolhida é apolar com composição de dimetilpolisiloxano (100%), permitindo, assim, separações e detecções adequadas ao método proposto.

O gás de arraste hidrogênio utilizado no método proposto, foi selecionado em função do detector utilizado neste método, por ionização em chama, que é um detector universal e apresenta bons níveis de detectabilidade e resposta (COLLINS et al., 2006).

Foram testados fluxo e rampa de aquecimento para otimização da separação dos compostos.

4.4.2 Preparo dos padrões para injeção em GC

Inicialmente foram preparadas soluções estoque dos padrões em piridina na concentração de $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em balões volumétricos de 2 mL.

4.4.3 Otimização da reação de derivatização

As reações de derivatização dos produtos da oxidação do glicerol foram testadas usando BSTFA e MSTFA. Os padrões contendo piridina foram adicionados em frascos de 5 mL, juntamente com o derivatizante (BSTFA ou MSTFA) e o solvente (heptano) e, posteriormente, levados para aquecimento em banho de óleo na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram retiradas do aquecimento, aguardaram a ambientação da temperatura e posteriormente foram injetadas no GC.

A quantidade de agente derivatizante (BSTFA/MSTFA) foi otimizada de forma a derivatizar todos os grupos hidroxilas dos analitos.

4.5 Reação de oxidação do glicerol

A reação de oxidação do glicerol foi realizada em um reator de inox em banho de óleo a 80 °C com agitação onde foram adicionados 480 mg de NaOH, 8,2 mg de catalisador, 10 mL de água e 360 mg de glicerol. A pressão do sistema foi ajustada para 5 bar com oxigênio e o tempo reacional de 3 horas.

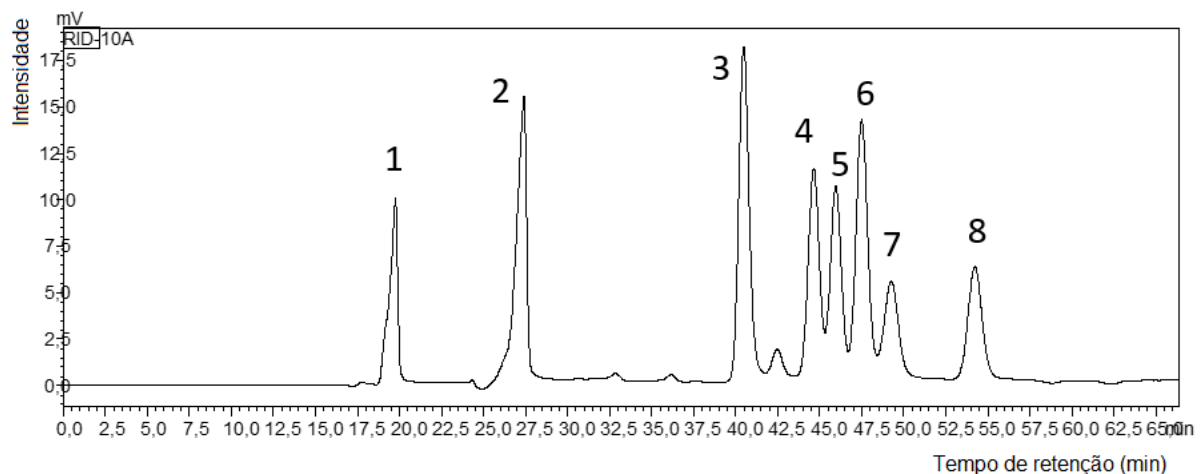
Ao término da reação, o reator foi removido do banho de óleo, esperado a diminuição da temperatura, despressurizado. Em seguida, o reator foi aberto para remoção do material, onde o mesmo foi armazenado em um tubo limpo. O material foi centrifugado para separação do catalisador e posterior análise em HPLC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da metodologia analítica utilizando HPLC

Inicialmente foi preparada uma solução de cada padrão analítico com intuito de determinar a ordem de eluição dos mesmos. A ordem de eluição dos compostos foi a seguinte: ácido oxálico, ácido tartrônico, gliceraldeído, ácido glicólico, ácido láctico, glicerol, ácido fórmico e ácido acético (Figura 9).

Figura 9 - Cromatograma obtido na análise da solução de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos padrões (1 ácido oxálico, 2 ácido tartrônico, 3 gliceraldeído, 4 ácido glicólico, 5 ácido láctico, 6 glicerol, 7 ácido fórmico e 8 ácido acético). Fase móvel H_3PO_4 10 mM, fluxo $0,35 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna $35 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: Autor (2016).

Estabelecido o tempo de retenção foram realizadas otimizações no método com variação da temperatura da coluna, taxa de fluxo e concentração da fase móvel.

A avaliação da resolução foi realizada de acordo com a Equação 3:

$$R_s = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2}$$

Equação 3.

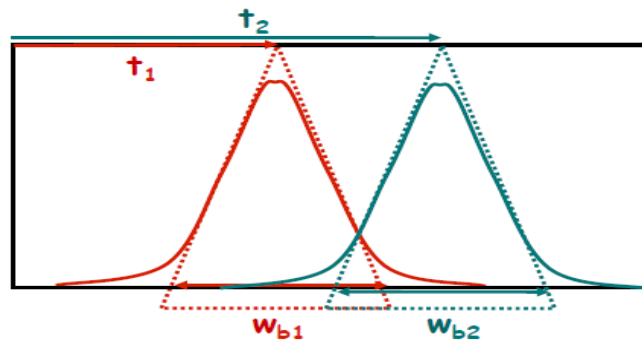
Onde: Δt é a distância entre os picos e w_1 e w_2 a largura na base dos mesmos de acordo com a representação da Figura 10. Este parâmetro serve para determinar se

o poder de separação do sistema para um par de analitos de interesse é mantido ao longo do tempo (LANÇAS, 2009).

Para compostos totalmente separados a resolução é maior que 1,5. Compostos que apresentam resolução igual a 1,00 estão razoavelmente separados, com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Compostos com resolução igual a 1,25 são suficientes para fins quantitativos e compostos com resolução acima de 1,5 são separados completamente (COLLINS et al., 2006).

Compostos com resolução abaixo de 1,00 apresentam coeluição e requerem otimizações (ARAGÃO et al., 2009).

Figura 10 - Parâmetros de avaliação da resolução em cromatografia.



Fonte: Autor (2016) - Adaptado de Carrilho, 2015.

Os testes iniciais de concentração da fase móvel foram baseados nos artigos publicados que trabalharam com H_3PO_4 (PORTA e PRATI, 2004; VILLA et al., 2010). A concentração inicial da fase móvel preparada foi de 10 mM.

De acordo com os testes iniciais, observou-se que os compostos 4, 5, 6 e 7 (ácido glicólico, ácido láctico, glicerol e ácido fórmico, apresentaram baixa resolução, sendo necessária a otimização do método.

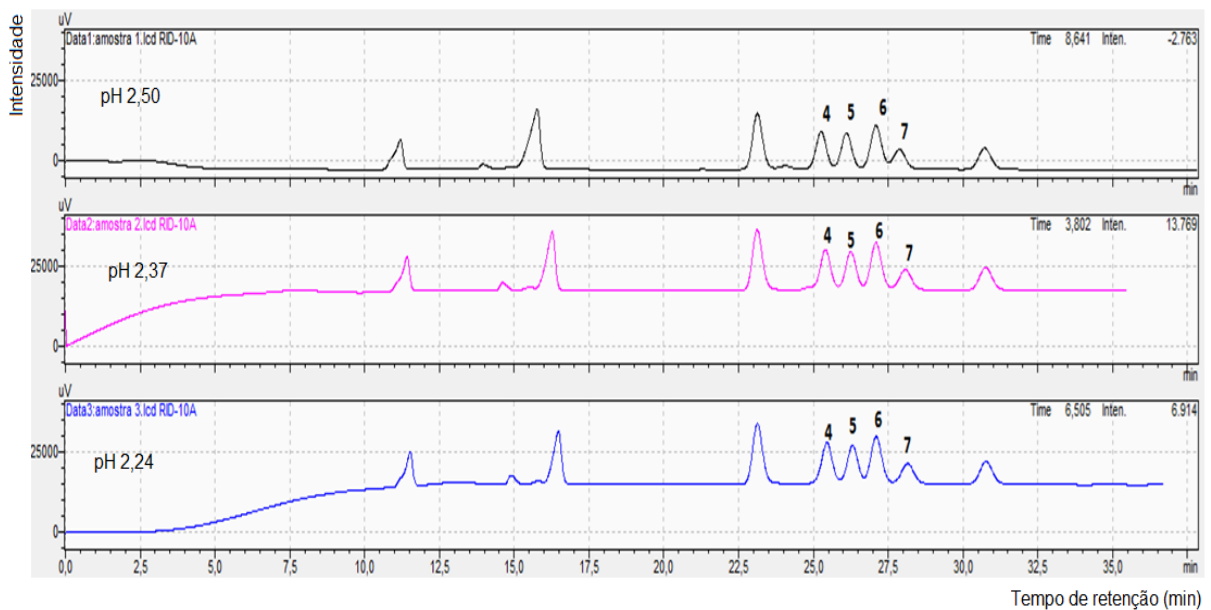
5.1.1 Otimização do pH da fase móvel

A otimização do método iniciou-se através da avaliação do pH da fase móvel o qual foi avaliado na faixa de 2,50 a 2,24. Os cromatogramas da Figura 11,

mostram o efeito da variação do pH na taxa de fluxo de 0,40 mL min⁻¹ com temperatura da coluna em 35 °C e temperatura do detector de 35 °C.

As resoluções obtidas para os compostos 4, 5, 6 e 7 com a variação do pH da fase móvel estão representadas na Tabela 6.

Figura 11 - Efeito do pH na resolução dos compostos (4 –ácido glicólico, 5 –ácido láctico, 6 –glicerol e 7 –ácido fórmico).



Fonte: Autor (2016).

Observou-se que o pH que apresentou melhor resolução para os compostos que apresentavam baixa resolução foi o pH 2,24 (4 mM), sendo estabelecido este pH para a continuação do desenvolvimento do método analítico. Quando o pH da fase móvel é menor que 2,24 começam a ocorrer mudanças na resolução dos compostos e no tempo de retenção dos mesmos.

Tabela 6 - Resolução dos compostos com variação do pH.

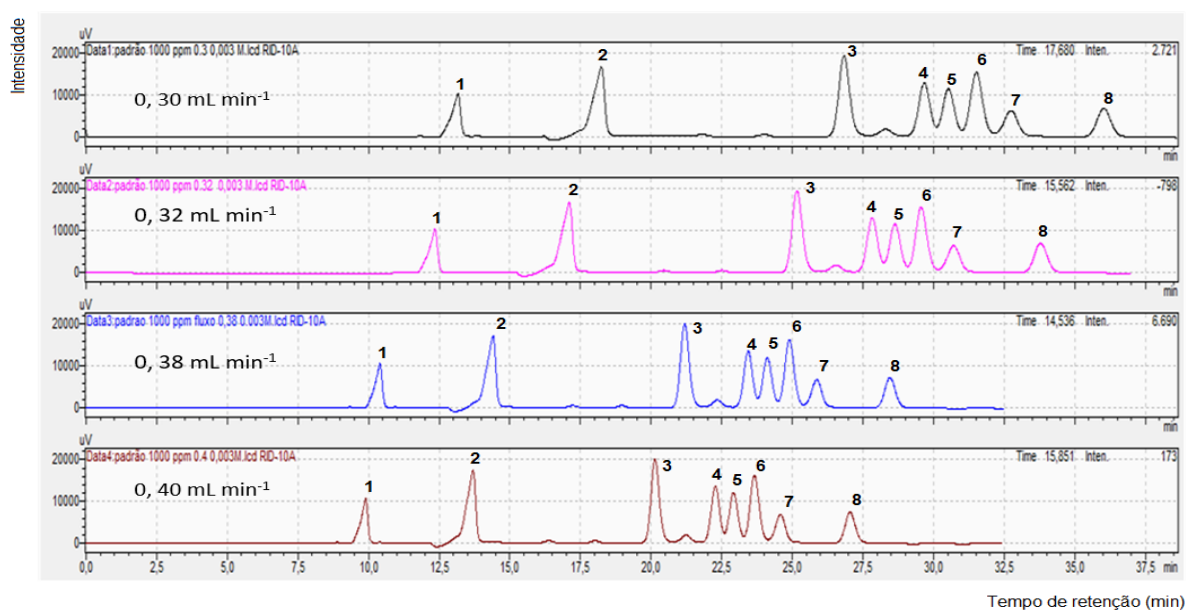
Compostos	Resolução		
	pH	2,50	2,37
Ácido glicólico e ácido láctico	1,35	1,38	1,46
Ácido láctico e glicerol	1,55	1,34	1,39
Glicerol e Ácido fórmico	1,23	1,43	1,48

Fonte: Autor (2016).

5.1.2 Otimização do fluxo da fase móvel

O fluxo da fase móvel foi avaliado de forma a obter um tempo reduzido de análise sem alteração na resolução dos compostos obtidos. A variação do fluxo estudada foi de 0,30 a 0,40 mL min⁻¹. A Figura 12 mostra os resultados obtidos nos testes cromatográficos para esta variação.

Figura 12 - Variação do fluxo da fase móvel no pH 2,24 (1 -ácido oxálico, 2 -ácido tartrônico, 3 -gliceraldeído, 4 -ácido glicólico, 5 -ácido láctico, 6 -glicerol, 7 -ácido fórmico e 8 -ácido acético).



Fonte: Autor (2016).

A Tabela 7 mostra que não ocorre alterações significativas na resolução dos compostos quando a taxa de fluxo é alterada (apenas no tempo de análise).

Tabela 7 - Resoluções obtidas para os compostos com a variação do fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL min ⁻¹)	RESOLUÇÃO			
	0,30	0,32	0,38	0,40
Tempo de análise (min)	37,5	35	30	28
Ácido glicólico e ácido láctico	1,23	1,23	1,23	1,23
Ácido láctico e glicerol	1,36	1,36	1,36	1,36
Glicerol e ácido fórmico	1,51	1,53	1,56	1,56

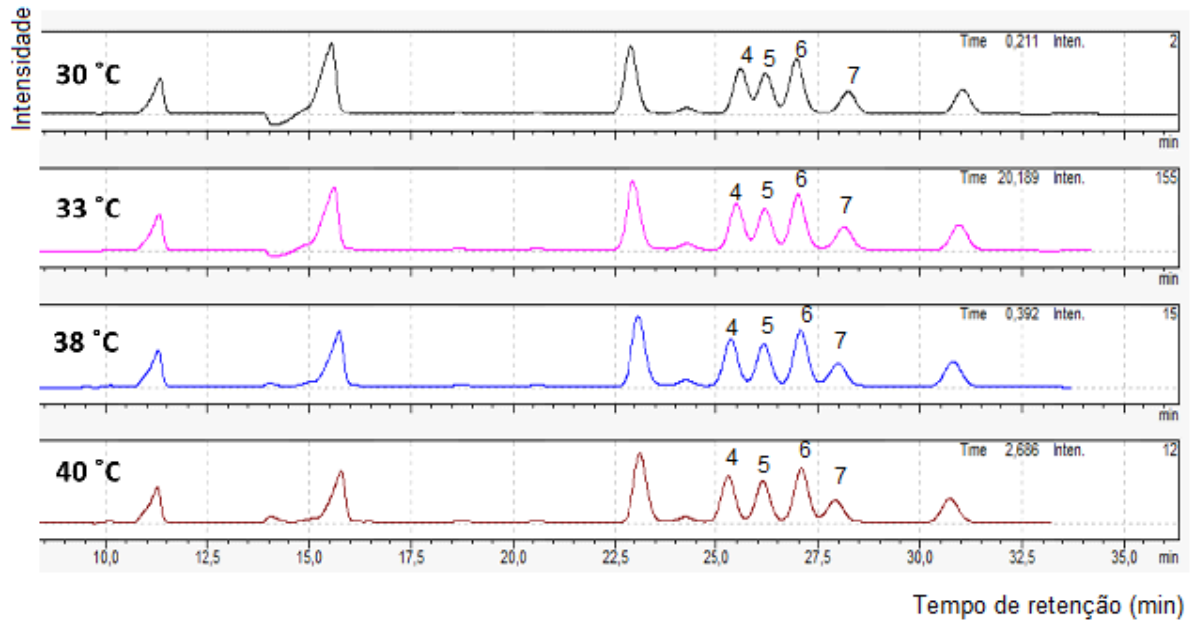
Fonte: Autor (2016).

Com o estudo e a otimização do fluxo da fase móvel foi obtida a diminuição do tempo de análise de 60 para 30 minutos. Sendo assim, estabeleceu-se um fluxo de 0,4 mL min⁻¹ para as corridas cromatográficas do método proposto.

5.1.3 Otimização da temperatura da coluna

A temperatura da coluna foi estudada de forma a melhorar a resolução dos compostos obtidos com os testes já realizados (fluxo e pH da fase móvel). A Figura 13 mostra os cromatogramas obtidos com a variação da temperatura da coluna de 30 a 40 °C.

Figura 13 - Variação da temperatura da coluna (4 –ácido glicólico, 5 –ácido láctico, 6 – glicerol e 7 –ácido fórmico).



Fonte: Autor (2016).

A Tabela 8 mostra os valores de resolução obtidos na variação da temperatura da coluna. De acordo com os valores de resolução obtidos foi fixada a temperatura de 40 °C para a otimização do método.

Tabela 8 - Resoluções obtidas para os compostos com a variação da temperatura da coluna.

COMPOSTOS	RESOLUÇÃO			
	30	33	38	40
Temperatura °C	30	33	38	40
Ácido glicólico e ácido láctico	1,13	1,19	1,30	1,35
Ácido láctico e glicerol	1,30	1,33	1,43	1,49
Glicerol e ácido fórmico	1,90	1,67	1,37	1,29

Fonte: Autor (2016).

5.1.4 Otimização da temperatura do detector

As temperaturas do detector testadas foram 35 °C e 45 °C e como pode ser observado na Tabela 9 na temperatura de 35 °C os compostos apresentaram melhor resolução.

Tabela 9 - Resoluções obtidas com a variação da temperatura do detector.

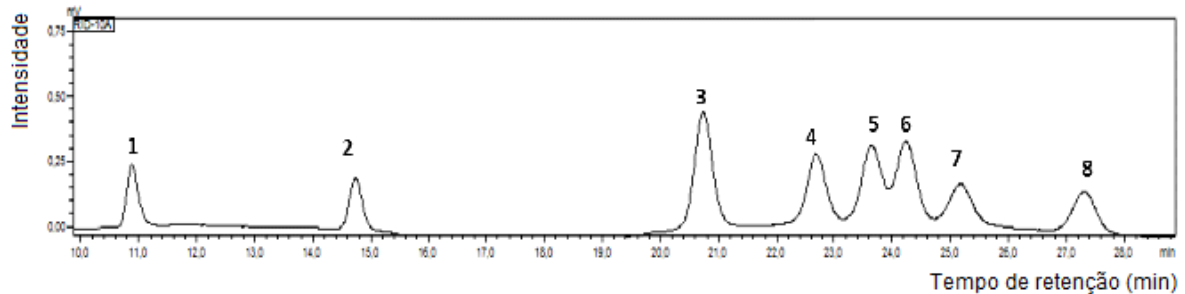
COMPOSTOS	RESOLUÇÃO	
	35 °C	45 °C
Temperatura		
Ácido glicólico e ácido láctico	1,35	1,32
Ácido láctico e glicerol	1,49	1,37
Glicerol e ácido fórmico	1,29	1,29

Fonte: Autor (2016).

5.2. Metodologia desenvolvida por HPLC

As condições ideais para a análise cromatográfica de acordo com a otimização da metodologia proposta foram: taxa de fluxo: 0,40 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40 °C, temperatura do detector de 35 °C e o pH da fase móvel 2,24. (Figura 14 e Tabela 10).

Figura 14 - Cromatograma obtido com a análise dos padrões analíticos concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas condições ideais estabelecidas, 1- ácido oxálico, 2- ácido tartrônico, 3- gliceraldeído, 4- ácido glicólico, 5- ácido láctico, 6- glicerol, 7- ácido fórmico, 8- ácido acético.



Fonte: Autor (2016).

Tabela 10 - Tempo de retenção dos padrões.

<i>Padrões</i>	<i>Tempo de Retenção (min)</i>
Ácido oxálico	10,88
Ácido tartrônico	14,72
Gliceraldeído	20,72
Ácido glicólico	22,68
Ácido láctico	23,63
Glicerol	24,23
Ácido fórmico	25,16
Ácido acético	27,30

Fonte: Autor (2016).

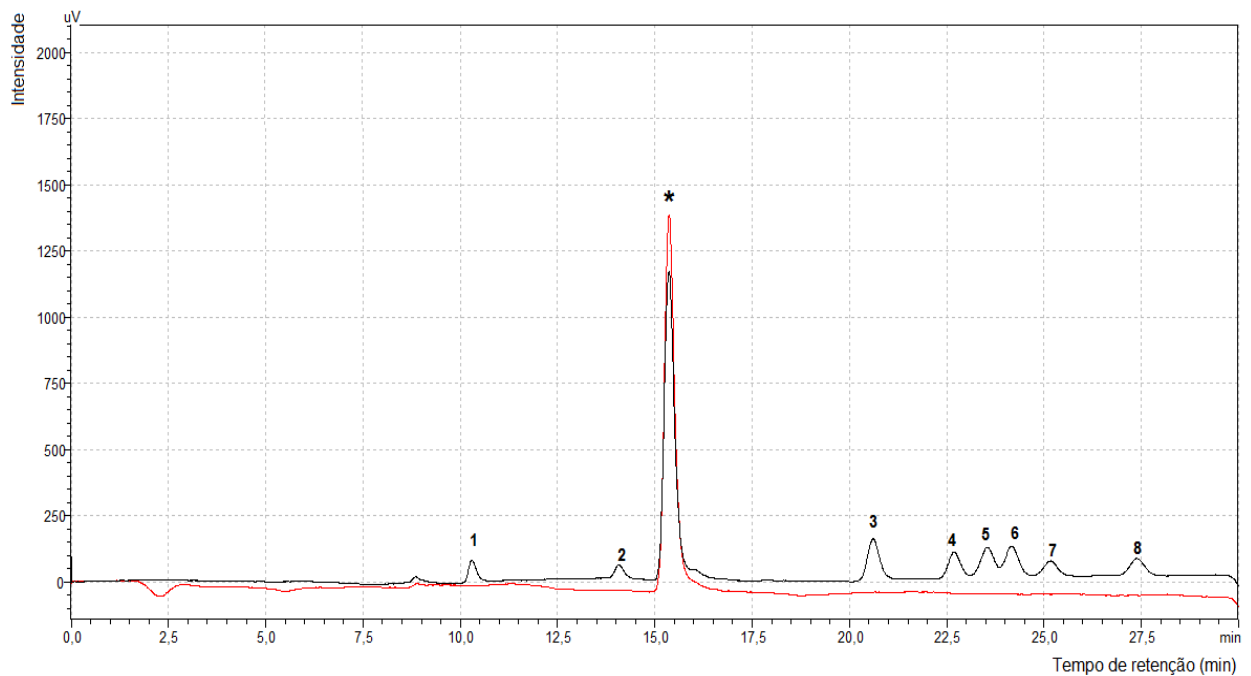
Estabelecidas as condições ideais para a separação, identificação e quantificação dos compostos iniciou-se o processo de validação da metodologia analítica por HPLC.

5.3 Validação do método de HPLC

5.3.1 Seletividade

O método proposto por HPLC apresentou seletividade de acordo com os requisitos exigidos pelo INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011). A Figura 15 mostra a sobreposição de uma matriz isenta dos analitos de interesse (vermelho) versus uma matriz fortificada com os analitos de interesse (preto). Como podemos observar a fase móvel manteve sua linha de base sem nenhum interferente. O pico sinalizado com (*) é referente ao sinal de um pico negativo invertido.

Figura 15 - Seletividade obtida pela fortificação da matriz isenta de analitos 1- ácido oxálico, 2- ácido tartrônico, 3- gliceraldeído, 4- ácido glicólico, 5- ácido láctico, 6- glicerol, 7- ácido fórmico, 8- ácido acético.



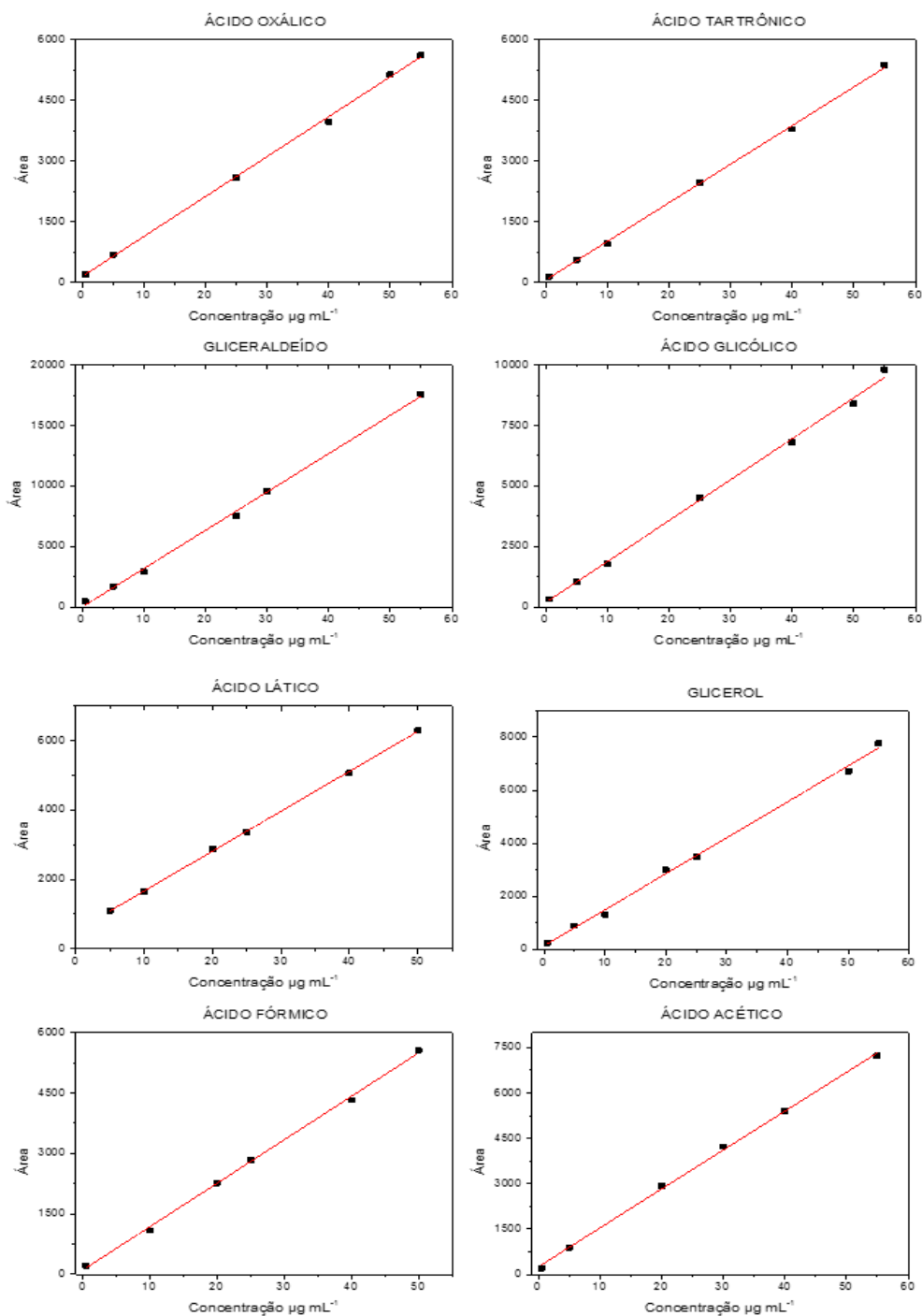
Fonte: Autor (2016).

5.3.2 Curva de calibração externa

A curva analítica foi preparada através da solução estoque de $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram realizados 10 pontos de diferentes concentrações variando de $0,5$ a $55 \mu\text{g mL}^{-1}$ e cada ponto foi analisado em triplicata. Os dados obtidos nas análises foram plotados no Origin 9.0[®] para obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação.

Os dados da linearidade e as curvas de calibração de cada padrão considerando a área dos picos obtidos no cromatograma foram representados na Figura 16.

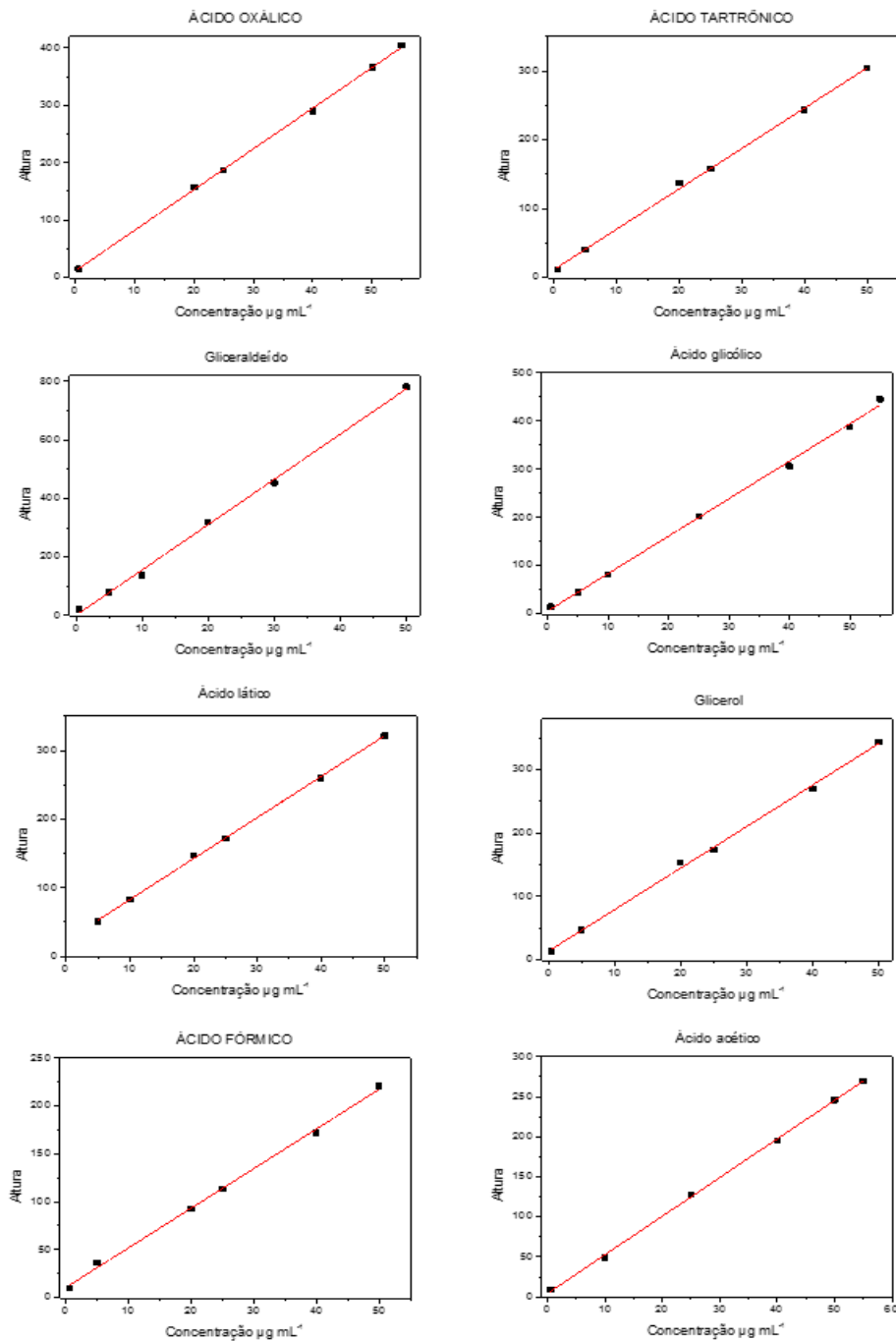
Figura 16 - Curvas de calibração externa obtidas para os padrões analíticos utilizando as áreas dos picos.



Fonte: Autor (2016).

As curvas analíticas também foram construídas levando-se como sinal analítico a altura dos picos. Os dados da linearidade e as curvas de calibração de cada padrão considerando a altura dos picos obtidos no cromatograma foram representados na Figura 17.

Figura 17 - Curvas de calibração externa obtidas para os padrões analíticos utilizando as alturas dos picos.



Fonte: Autor (2016).

Os intervalos lineares dos padrões estão representados na Tabela 11 de acordo com a área e a altura dos picos.

Tabela 11 - Intervalo linear obtido das curvas de calibração.

Padrões	Intervalo Linear $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Área do pico	Altura do pico
Ácido oxálico	5,39 - 55	4,68 - 55
Ácido tartrônico	4,45 - 55	5,31 - 50
Gliceraldeído	5,90 - 55	5,46 - 50
Ácido glicólico	3,95 - 55	6,54 - 55
Ácido láctico	4,90 - 50	3,89 - 50
Glicerol	5,44 - 55	6,34 - 50
Ácido fórmico	5,51 - 50	6,16 - 50
Ácido acético	5,84 - 55	4,03 - 55

Fonte: Autor (2016).

5.3.3 Linearidade

A linearidade do método proposto apresentou valores de coeficientes de correlação (r) considerados bons (0,9978 a 0,9998) de acordo com a classificação do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011), tanto na determinação pela altura do pico, quanto da área do pico conforme os resultados apresentados na Tabela 12. Quanto mais próximo de 1 o valor de r estiver maior a relação linear. As equações da reta

foram plotadas no Origin 9.0[®] para posteriores cálculos de concentração e para a validação do método analítico proposto. De acordo com os dados obtidos a maior sensibilidade do método foi observada quando a área do pico era considerada para os cálculos (coeficientes angulares maiores quando comparados com altura do pico).

Tabela 12 - Coeficientes de correlação e equação da reta da curva analítica.

Padrões analíticos	Área do pico		Altura do pico	
	R	Equação	r	Equação
Ácido oxálico	0,9996	$y = 147,61275 + 98,80241x$	0,9997	$y = 11,46378 + 7,09563x$
Ácido tartrônico	0,9996	$y = 60,57031 + 95,49504x$	0,9993	$y = 11,69956 + 5,85981x$
Gliceraldeído	0,9991	$y = -20,8781 + 317,18939x$	0,9991	$y = 1,26461 + 15,47543x$
Ácido glicólico	0,9988	$y = 230,8252 + 164,4601x$	0,9991	$y = 5,89697 + 7,76939x$
Ácido láctico	0,9998	$y = 601,7020 + 112,60322x$	0,9997	$y = 23,25 + 5,96667x$
Glicerol	0,9978	$y = 164,3252 + 129,8564x$	0,9991	$y = 13,56163 + 6,56083x$
Ácido fórmico	0,9993	$y = 100,8983 + 107,8564x$	0,9991	$y = 10,67061 + 4,1315x$
Ácido acético	0,9993	$y = 249,1872 + 128,7633x$	0,9998	$y = 4,47539 + 4,82076x$

Fonte: Autor (2016).

5.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção foram calculados de acordo com o método baseado em parâmetros da curva analítica. Na determinação pela área dos picos obtidos foi obtido um intervalo de 1,30 – 1,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o limite de detecção e para o limite de quantificação 3,95 – 5,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Da mesma forma que os limites de detecção e quantificação, observados levando em consideração a altura do pico, a faixa de variação observada foi de 1,28 – 2,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 3,89 – 6,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, conforme mostra a Tabela 13.

Tabela 13 - Limite de detecção e limite de quantificação.

Limite de detecção e limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
Padrões	Área do pico		Altura do pico	
	LD	LQ	LD	LQ
Ácido oxálico	1,78	5,39	1,54	4,68
Ácido tartrônico	1,46	4,45	1,75	5,31
Gliceraldeído	1,94	5,90	1,80	5,46
Ácido glicólico	1,30	3,95	2,15	6,54
Ácido láctico	1,61	4,90	1,28	3,89
Glicerol	1,79	5,44	2,09	6,34
Ácido fórmico	1,81	5,51	2,03	6,16
Ácido acético	1,92	5,84	1,33	4,03

Fonte: Autor (2016).

5.3.5 Precisão

5.3.5.1 Precisão instrumental

A precisão instrumental do método foi avaliada através da injeção de uma amostra 10 vezes, seguido por um branco com determinação do desvio padrão e do coeficiente de variação. Os valores de desvio padrão e coeficientes de variação (CV) obtidos estão apresentados na Tabela 14. Estes resultados mostram que a metodologia proposta é precisa, uma vez que os valores de desvio padrão e coeficiente de variação obtidos foram $\leq 1,11$ e $\leq 3,60$ respectivamente o que indica que estes parâmetros avaliados apresentam um conjunto de dados homogêneos.

Tabela 14 - Precisão instrumental.

<i>Padrões analíticos</i>	<i>Área do pico</i>		<i>Altura do Pico</i>	
	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>
Ácido oxálico	1,11	3,60	0,83	2,69
Ácido tartrônico	1,09	3,59	0,90	2,87
Gliceraldeído	0,86	2,86	0,76	2,69
Ácido glicólico	0,87	2,68	0,79	2,49
Ácido láctico	0,93	3,00	0,87	2,81
Glicerol	0,85	2,67	0,85	2,70
Ácido fórmico	1,00	3,27	0,88	2,83
Ácido acético	1,04	3,37	0,81	2,60

Fonte: Autor (2016).

5.3.5.2 Repetitividade

A repetitividade foi avaliada com a injeção de 10 amostras na concentração de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidas em diferentes preparações. Os resultados de área e altura foram plotados nas curvas de calibração para determinação da concentração. Das concentrações foram determinados o desvio padrão e o CV. Os CV obtidos tanto pela área como pela altura do pico foram $\leq 8,98\%$ conforme mostra a Tabela 15.

Tabela 15 - Repetitividade.

<i>Padrões</i>	<i>Área do pico</i>		<i>Altura do Pico</i>	
	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>
Ácido oxálico	1,29	3,57	2,29	6,44
Ácido tartrônico	1,59	7,18	1,54	6,53
Gliceraldeído	2,20	6,68	1,88	6,10
Ácido glicólico	1,97	6,12	1,98	5,88
Ácido láctico	3,58	8,98	3,14	8,09
Glicerol	2,67	6,88	2,38	6,28
Ácido fórmico	1,88	5,43	1,98	5,51
Ácido acético	3,01	8,62	2,34	6,57

Fonte: Autor (2016).

5.3.5.3 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada com a injeção de 10 amostras na concentração de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidas em diferentes preparações com outro analista. Os resultados de área e altura foram plotados nas curvas de calibração para determinação da concentração. Das concentrações foram determinados o desvio padrão e o CV. Os CV obtidos tanto pela área como pela altura do pico foram $\leq 9,34\%$ conforme mostra a Tabela 16.

Tabela 16 - Determinação da precisão intermediária.

<i>Padrões</i>	<i>Área do pico</i>		<i>Altura do Pico</i>	
	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV %</i>
Ácido oxálico	1,73	8,87	0,81	4,16
Ácido tartrônico	1,64	7,58	1,13	5,25
Gliceraldeído	1,79	8,86	1,45	7,21
Ácido glicólico	1,71	7,64	1,24	5,66
Ácido láctico	2,30	9,24	1,89	7,48
Glicerol	1,26	7,72	1,30	7,14
Ácido fórmico	1,59	8,29	1,38	7,51
Ácido acético	1,72	9,34	1,36	7,49

Fonte: Autor (2016).

Os resultados obtidos na precisão intermediária foram comparados com os resultados obtidos no teste de repetitividade para comparação entre analistas. De acordo com a Tabela 17, é possível observar que os CV apresentaram resultados similares entre os analistas.

Tabela 17 - Comparativo entre analistas na determinação da precisão intermediária.

<i>Padrões</i>	<i>Área do pico</i>		<i>Altura do Pico</i>	
	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Ácido oxálico	3,57	8,87	6,44	4,16
Ácido tartrônico	7,18	7,58	6,53	5,25
Gliceraldeído	6,68	8,86	6,10	7,21
Ácido glicólico	6,12	7,64	5,88	5,66
Ácido láctico	8,98	9,24	8,09	7,48
Glicerol	6,88	7,72	6,28	7,14
Ácido fórmico	5,43	8,29	5,51	7,51
Ácido acético	8,62	9,34	6,57	7,49

Fonte: Autor (2016).

De acordo com os dados obtidos na precisão instrumental, intermediária e repetitividade foram adotados os valores de erros para as medidas realizadas neste trabalho de acordo com a Tabela 18.

Tabela 18 - Erros adotados para as medidas realizadas.

Padrões	Área do pico	Altura do pico
	Desvio padrão	
Ácido oxálico	1,73	2,29
Ácido tartrônico	1,64	1,54
Gliceraldeído	2,20	1,88
Ácido glicólico	1,97	1,98
Ácido láctico	3,58	3,14
Glicerol	2,67	2,38
Ácido fórmico	1,88	1,98
Ácido acético	3,01	2,34

Fonte: Autor (2016).

5.3.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada de duas formas: com uma amostra real obtida na reação de oxidação do glicerol com fortificação desta amostra com $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ e através da fortificação da matriz desta amostra isenta dos produtos. A Tabela 19 mostra os valores de recuperação obtidos pela área do pico e a Tabela 20 mostra os valores de recuperação obtidos pela altura do pico para os 4 compostos presentes na amostra real de oxidação do glicerol (gliceraldeído, ácido glicólico, ácido láctico e ácido fórmico).

Tabela 19 - Exatidão do método proposto considerando a área do pico para amostra real.

Compostos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Recuperação %
	Amostra	Padrões adicionados	Total	Quantidade encontrada	
Gliceraldeído	7,2720	15	22,2720	22,4107	100,62
Ácido glicólico	4,4520	15	19,4520	19,4065	99,76
Ácido láctico	6,1539	15	21,1539	21,7169	102,66
Ácido fórmico	7,2256	15	22,2256	22,7104	102,18

Fonte: Autor (2016).

Tabela 20 - Exatidão do método proposto considerando a altura do pico para amostra real.

Compostos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Recuperação %
	Amostra	Padrões adicionados	Total	Quantidade encontrada	
Gliceraldeído	7,3750	15	22,3750	21,8657	97,72
Ácido glicólico	11,3499	15	26,3499	26,9476	102,26
Ácido láctico	5,4861	15	20,4861	21,8394	106,60
Ácido fórmico	8,2731	15	23,2731	23,6338	101,54

Fonte: Autor (2016).

Na avaliação da exatidão com a matriz isenta dos padrões de interesse foram adicionados $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura de padrões e posteriormente determinada a concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada padrão. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 21.

Tabela 21 - Recuperação com matriz isenta de padrões.

Padrões analíticos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Recuperação (%)			
	Matriz	Adicionado	Total	Encontrado		Área	Altura
				Área	Altura		
Ácido oxálico	0	10	10	9,8734	10,0152	98,73	100,15
Ácido tartrônico	0	10	10	10,13456	10,5679	101,34	105,67
Gliceraldeído	0	10	10	9,9761	9,5702	99,76	95,70
Ácido glicólico	0	10	10	10,7834	10,5193	107,83	105,19
Ácido láctico	0	10	10	10,6312	10,4039	106,31	104,03
Glicerol	0	10	10	9,9729	10,0021	99,72	100,02
Ácido fórmico	0	10	10	10,3952	10,2103	103,95	102,10
Ácido acético	0	10	10	9,978	9,8039	99,78	98,03

Fonte: Autor (2016).

Os ensaios obtidos através da recuperação tanto na área como na altura do pico, mostram-se adequados para a faixa de recuperação em função da concentração dos analitos pelos dois métodos de recuperação realizados. O % de recuperação ficou entre 95,70 a 107,83% o que está de acordo com a recuperação estabelecida para este nível de concentração (80-110%) pelo Manual de métodos oficiais de análises (BRITO et al., 2003).

5.3.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada de acordo com os parâmetros testados no desenvolvimento do método. Foram avaliados pH ($\pm 0,1$), temperatura (± 5 °C) e taxa de fluxo. Os resultados obtidos no teste de robustez estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultado dos testes de robustez.

<i>Variável</i>	<i>Condições investigadas</i>	<i>Valor otimizado</i>
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,30	0,40
	0,32	
	0,38	
	0,40	
Temperatura da coluna (° C)	35	40
	40	
	45	
pH fase móvel	2,14	2,24
	2,24	
	2,34	

Fonte: Autor (2016).

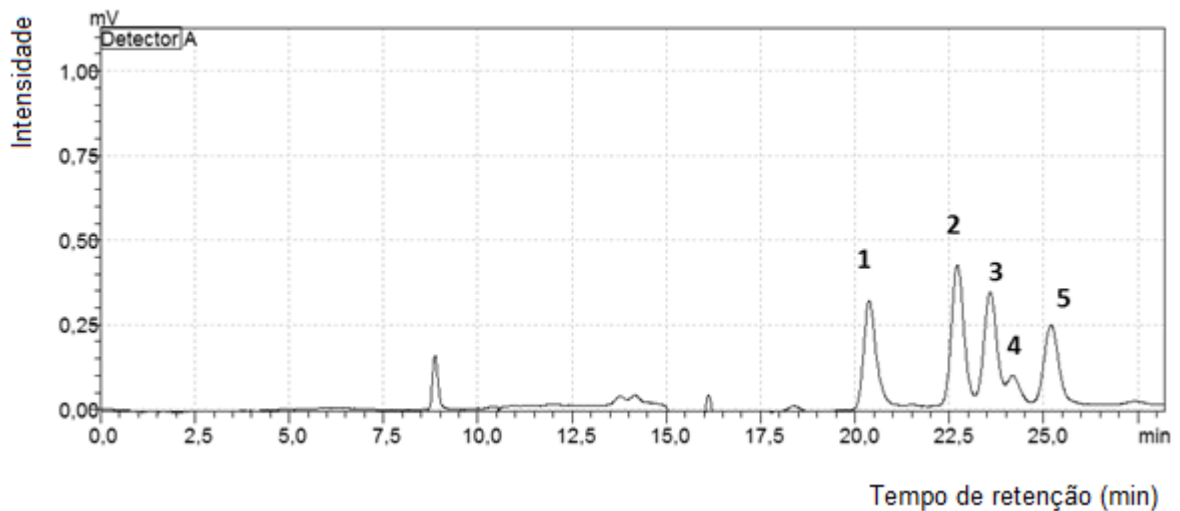
O método proposto é robusto para pequenas variações de temperatura (± 5 °C), com alterações insignificativas na resolução e no tempo de retenção. Na avaliação da robustez pelo pH da fase móvel, foram observadas alterações quando o pH estudado foi 2,14. Já no pH 2,34 ocorreram pequenas alterações na resolução

dos compostos tornando o método robusto apenas para o aumento do pH em 0,1. As modificações do fluxo estudadas alteraram apenas o tempo de análise.

5.4. Aplicação da metodologia proposta

Após a validação do método foi obtida uma amostra de uma reação teste de oxidação do glicerol realizada no GCaR para análise dos possíveis produtos formados. A Figura 18 mostra os 5 produtos que foram obtidos na reação de oxidação do glicerol (gliceraldeído, ácido glicólico, ácido láctico, glicerol e ácido fórmico).

Figura 18 - Produtos obtidos na reação teste de oxidação do glicerol (1- gliceraldeído, 2- ácido glicólico, 3- ácido láctico, 4- glicerol e 5- ácido fórmico).



Fonte: Autor (2016).

Como pode ser visto na Figura 18, foram identificados 5 compostos na reação teste da oxidação do glicerol, porém apenas 4 destes compostos foram quantificados. O composto 4- glicerol foi apenas identificado, não sendo possível sua quantificação. Foram encontrados $6,3630 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gliceraldeído, $7,4520 \mu\text{g mL}^{-1}$, de ácido glicólico, $6,0453 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido láctico e $7,2256 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido fórmico levando em consideração a área do pico para os cálculos. Pela altura do pico foram

encontrados $6,4875 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gliceraldeído, $7,7833 \mu\text{g mL}^{-1}$, de ácido glicólico, $5,9861 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido láctico e $7,1700 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido fórmico.

5.5. Comparação das metodologias

Os resultados obtidos foram comparados com trabalhos já relatados na literatura científica. A Tabela 23 mostra a comparação dos resultados obtidos neste trabalho com o artigo 1 e artigo 2. No método proposto considerando a taxa de fluxo e o tempo de análise foram gastos em torno de 11,2 mL de solvente para cada amostra a ser analisada quando comparado com os outros trabalhos que gastaram em torno de 12, 5 mL de solvente. Também no método desenvolvido foram identificados 8 possíveis produtos da reação de oxidação do glicerol em diferentes condições reacionais. O detector utilizado no trabalho foi o índice de refração, ao passo que, o único método (artigo 2) desenvolvido, validado e relatado na literatura científica utilizou dois detectores em série (UV-IR). O uso de dois detectores fica limitado pela disponibilidade de alguns laboratórios.

Tabela 23 - Comparação entre os métodos relatados na literatura científica e o método proposto neste trabalho.

PARÂMETROS	ARTIGO 1	ARTIGO 2	MÉTODO DESENVOLVIDO
<i>Reação</i>	Fermentação glicerol	Oxidação do glicerol	Oxidação do glicerol
<i>Fase móvel</i>	H ₂ SO ₄ Acetonitrila	H ₂ SO ₄	H ₃ PO ₄
<i>Taxa de fluxo</i>	0,5 mL min ⁻¹	0,5 mL min ⁻¹	0,4 mL min ⁻¹
<i>Produtos de interesse</i>	02	07	08
<i>Tempo de análise</i>	25 min	25 min	28 min
<i>Temperatura Coluna</i>	25 °C	70 °C	40 °C
<i>Detector</i>	IR	UV/IR	IR
<i>Principais problemas</i>	Preparo da amostra	Coeluição	-
<i>Faixa de trabalho</i>	40- 15000 µg mL ⁻¹	1000 -10000 µg mL ⁻¹	1,30 a 55 µg mL ⁻¹

Fonte: Autor (2016).

5.6. Desenvolvimento da metodologia analítica baseada em cromatografia gasosa

Inicialmente testou-se uma metodologia convencional a qual está especificada na Tabela 24, com uma coluna apolar de 60 metros.

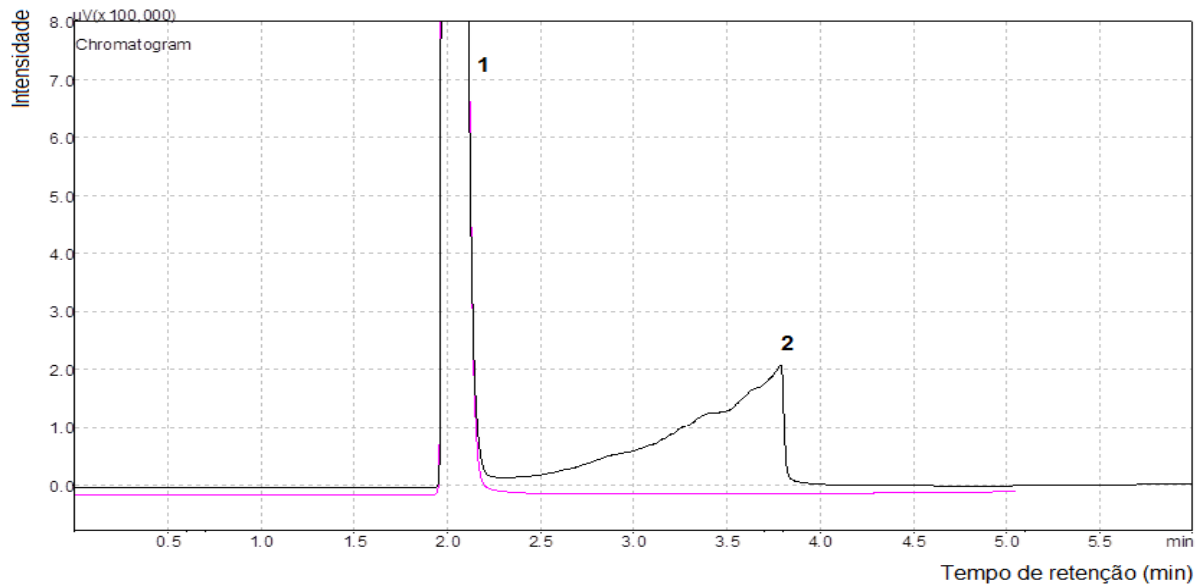
Tabela 24 - Condições cromatográficas utilizadas na metodologia baseada em cromatografia gasosa.

<i>Modo de injeção</i>	Split 1:20
<i>Temperatura do injetor</i>	180 ° C
<i>Volume de injeção</i>	0,5 µL
<i>Fluxo da fase móvel (H₂)</i>	1,10 mL min ⁻¹
<i>Temperatura do detector</i>	300 ° C
<i>Temperatura do forno</i>	150 ° C $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 300 ° C
<i>Tempo total de corrida</i>	15 minutos

Fonte: Autor (2016).

Foi injetada uma amostra de glicerol não derivatizado para observar o comportamento do mesmo em GC. Pela Figura 19 podemos observar que não é possível identificar de forma adequada o glicerol sem que seja realizado o processo de derivatização de forma a tornar a molécula estável termicamente. Foram injetadas amostras de glicerol sem derivatizar em diversas concentrações, porém só em concentrações acima de 25000 µg mL⁻¹ é possível detectar o mesmo conforme mostra o pico 2. (O pico 1 é relativo ao solvente utilizado, piridina).

Figura 19 - Cromatograma obtido para a análise de glicerol a $25000 \mu\text{g mL}^{-1}$ sem derivatização, 1 –piridina, 2 – glicerol sem derivatizar.

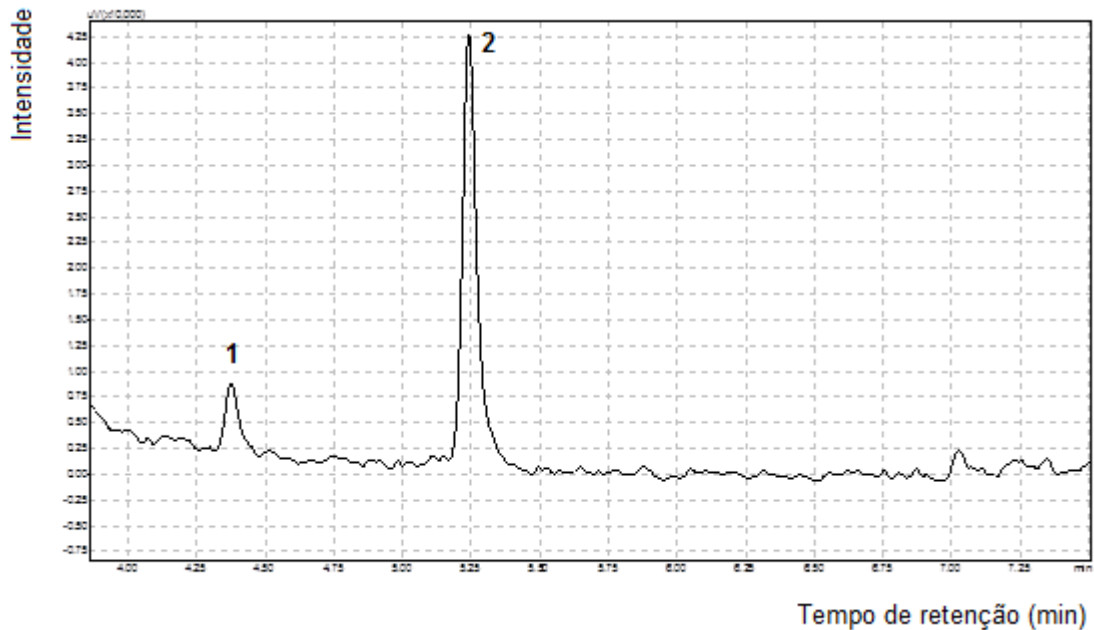


Fonte: Autor (2016).

5.6.1 Otimização da reação de derivatização

Os testes iniciais de derivatização foram realizados com glicerol, pois o mesmo apresenta 3 grupos hidroxilas e, portanto, seria o analito mais complexo. Foram realizados testes para verificar a quantidade de agente derivatizante necessária para derivatizar os 3 grupos hidroxilas presentes na molécula. A reação inicial de derivatização do glicerol foi realizada com 50 μL de glicerol $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$, 300 μL de heptano e 25 μL de MSTFA. O cromatograma está representado na Figura 20.

Figura 20 - Cromatograma obtido para o glicerol derivatizado com MSTFA.

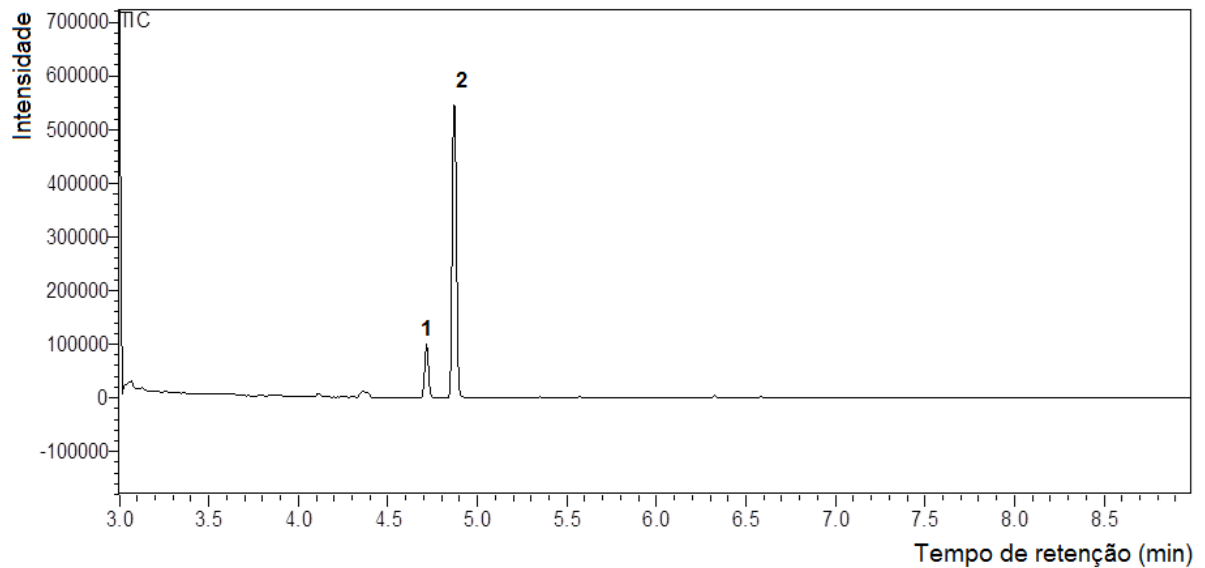


Fonte: Autor (2016).

Como podemos observar no cromatograma representado na Figura 20, apenas 25 μL de MSTFA não foram suficientes para a completa derivatização do glicerol pois foram identificados 2 picos. Essa amostra foi levada ao GC-MS para identificação individual de cada pico.

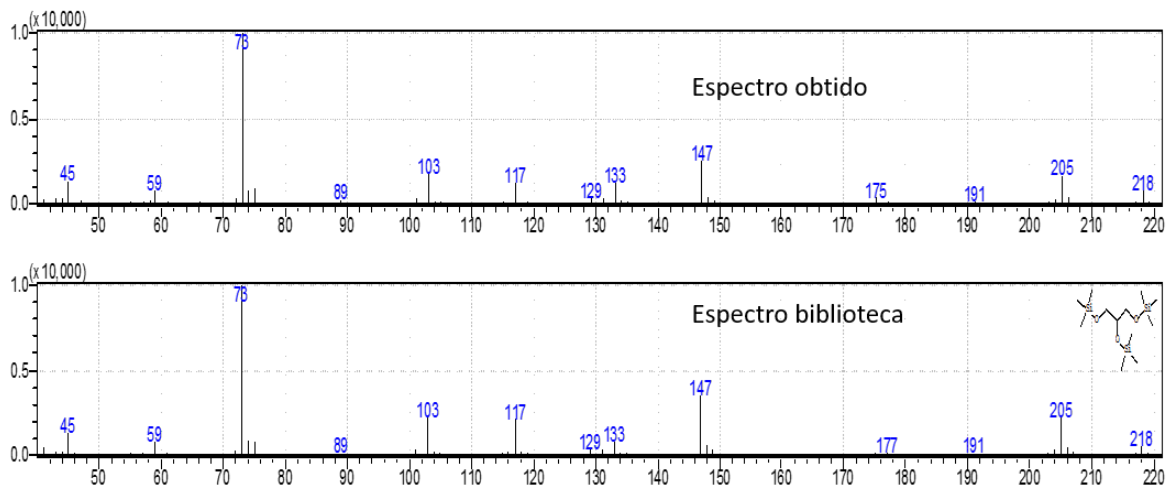
A Figura 21 mostra o cromatograma obtido na injeção da amostra de glicerol derivatizado com MSTFA no GC/MS. O pico número 1 é equivalente a molécula de glicerol parcialmente derivatizado e o pico 2 corresponde ao glicerol derivatizado o que foi comprovado pela comparação do espectro de íons gerado com o espectro de íons obtido da biblioteca NIST 08 - 2008 do equipamento com 90% de similaridade, conforme Figura 22.

Figura 21- Cromatograma obtido na análise do glicerol derivatizado com MSTFA.



Fonte: Autor (2016).

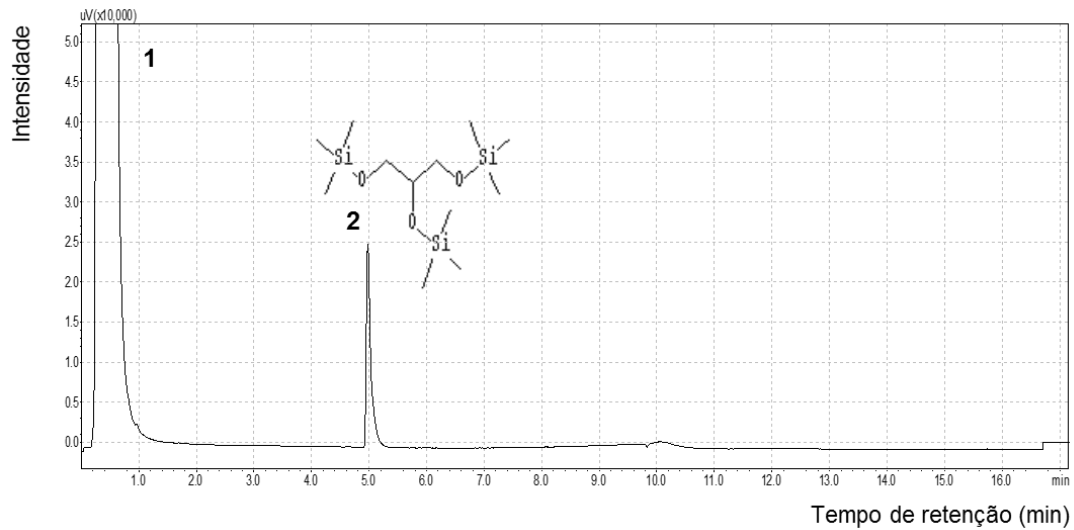
Figura 22 - Espectro de íons obtidos para a identificação do glicerol derivatizado com MSTFA, Biblioteca NIST 08-2008.



Fonte: Autor (2016).

Foram realizados outros testes aumentando a quantidade de derivatizante para 50 μL , quantidade suficiente para derivatizar todas as 3 hidroxilas presentes no glicerol, conforme mostra a Figura 23. O pico 1 é referente aos solventes e ao grupo de saída da reação de derivatização e o pico 2 é referente ao glicerol derivatizado.

Figura 23 - Glicerol derivatizado com MSTFA (1 –solventes, 2 –glicerol derivatizado).



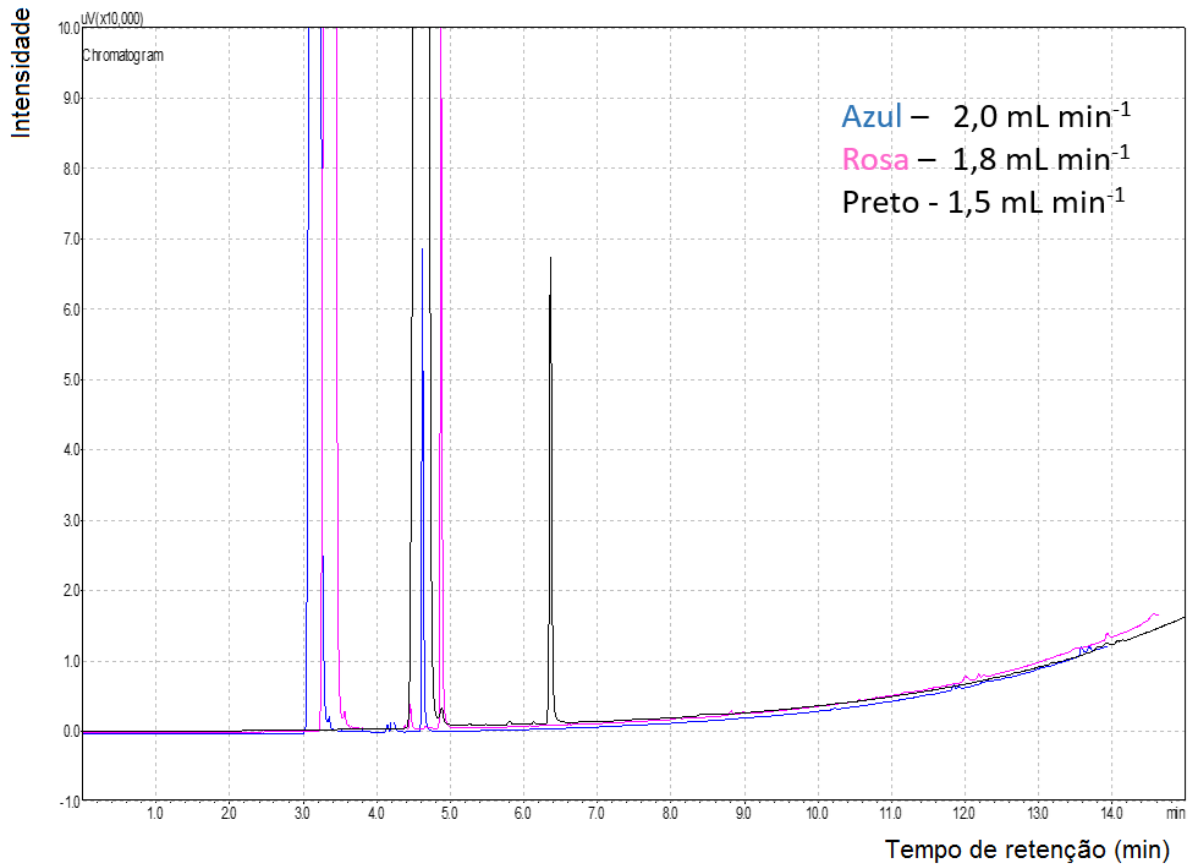
Fonte: Autor (2016).

5.6.2 Otimização do fluxo da fase móvel

Estabelecida a quantidade mínima de agente derivatizante para derivatização do glicerol foi estudado o fluxo da fase móvel para a diminuição do tempo de retenção dos solventes e conseqüentemente dos analitos.

As variações do fluxo foram executadas em 3 diferentes fluxos 2.0, 1.8 e 1.5 mL min⁻¹. No cromatograma da Figura 24 estão representados os diferentes cromatogramas obtidos para a variação do fluxo para o padrão de glicerol derivatizado. O fluxo foi otimizado em 2.0 mL min⁻¹ pois neste fluxo os solventes eluíram entre 3 e 4 minutos, já nos outros fluxos os solventes eluíram entre 4 e 5 minutos. Essa otimização também reduziu o tempo de retenção do glicerol.

Figura 24 - Cromatogramas obtidos com as variações de fluxo da fase móvel.

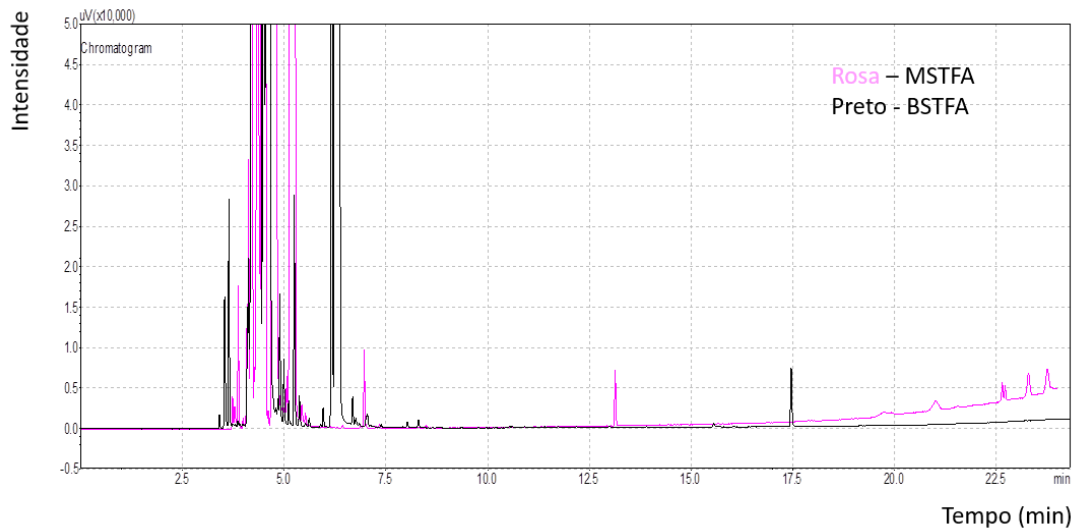


Fonte: Autor (2016).

5.6.3 Determinação dos tempos de retenção dos analitos derivatizados

Estabelecido o fluxo de fase móvel, foram realizadas as derivatizações dos outros compostos e injetados nas condições estabelecidas. Para o padrão de gliceraldeído não foi possível realizar sua derivatização com MSTFA pois o mesmo não era derivatizado totalmente, mesmo adicionando-se 100 μL de MSTFA, o cromatograma apresentava diversos picos (rosa) referentes ao gliceraldeído não derivatizado completamente. Com o uso de 50 μL BSTFA a derivatização do gliceraldeído foi obtida com êxito. Ambas as análises estão representadas na Figura 25.

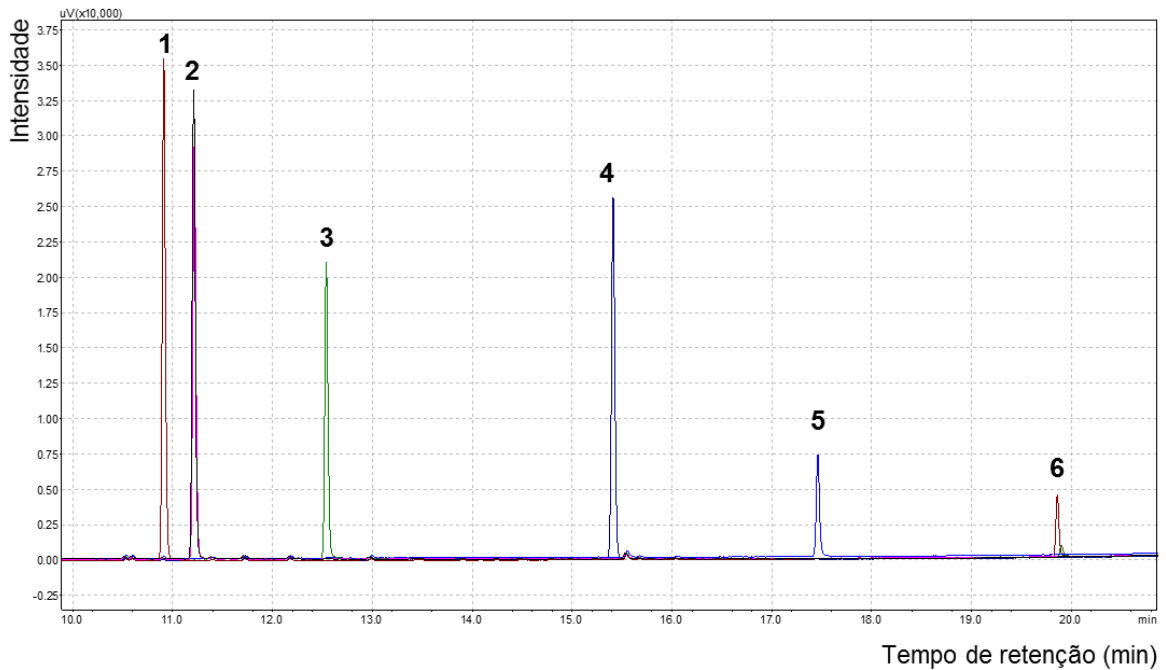
Figura 25 - Cromatograma obtido na derivatização do gliceraldeído com MSTFA.



Fonte: Autor (2016).

Na Figura 26 está representado o cromatograma obtido para os padrões de interesse no método proposto.

Figura 26 - Cromatograma obtido na injeção dos padrões analíticos 1- ácido láctico, 2- gliceraldeído + ácido glicólico, 3- ácido oxálico, 4- dihidroxiacetona, 5- glicerol, 6- ácido láctico.

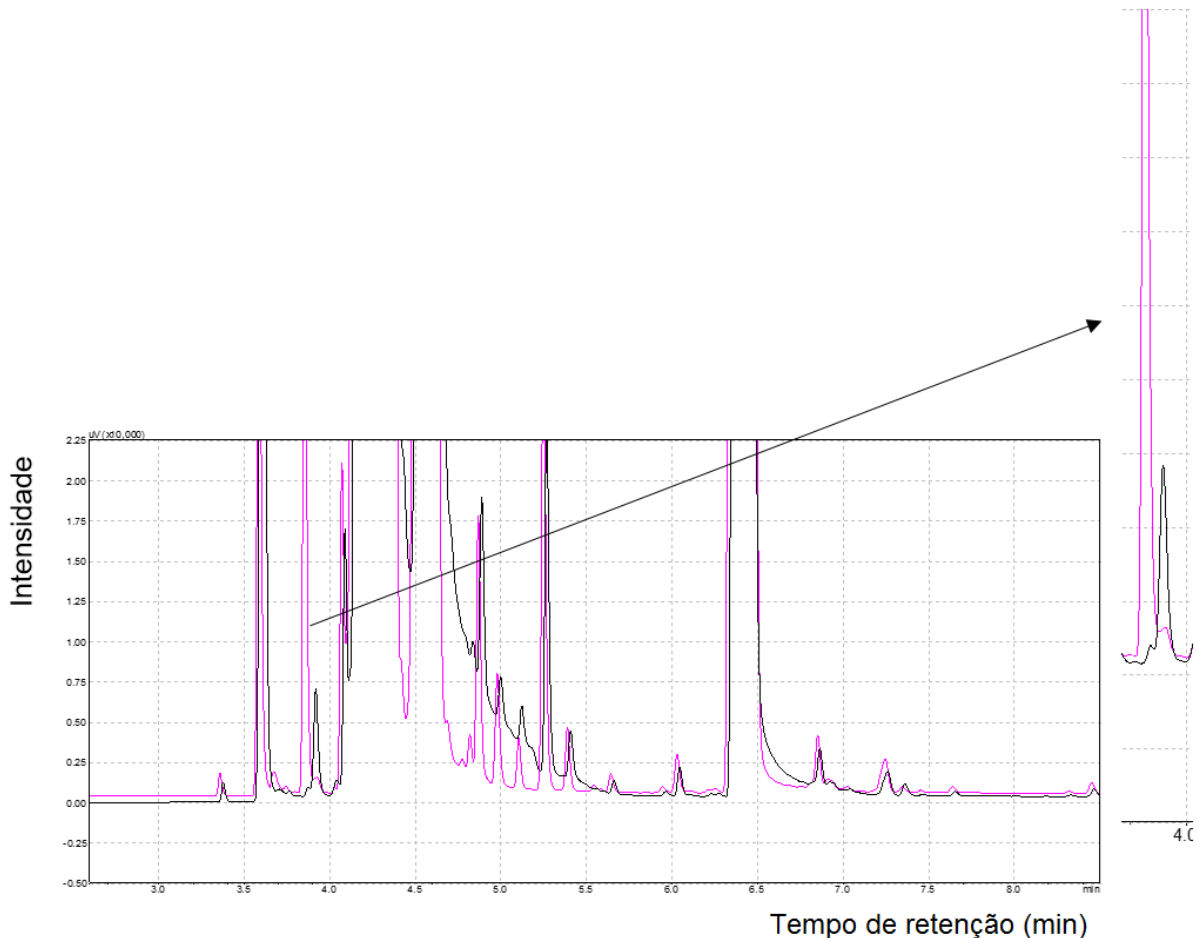


Fonte: Autor (2016).

Conforme representado na Figura 26 os compostos ácido láctico e gliceraldeído apresentaram coeluição, sendo necessário mais otimizações para obter uma melhor resolução entre os compostos.

Os compostos ácido fórmico e ácido acético nos testes realizados são eluídos entre os picos do solvente, sendo necessário a realização de otimização para melhorar a separação, conforme mostra o cromatograma da Figura 27.

Figura 27 - Cromatograma obtido na derivatização do ácido acético e ácido fórmico.



Fonte: Autor (2016).

Como as reações de oxidação do glicerol são realizadas em meio aquoso, o que dificulta a reação de derivatização e conseqüentemente a identificação destes compostos por GC, será necessário utilizar métodos de extração de analitos da água e posterior ensaio de derivatização dos mesmos para aplicação desta metodologia. Um dos métodos atuais que a literatura científica reporta para alguns tipos de analitos é o uso de fibras de SPME (microextração em fase sólida), a qual consiste

em colocar esta fibra em contato com a solução com os analitos de interesse para a extração. Com esta metodologia será necessário avaliar diversos parâmetros, como tipo de fibra, tempo de extração, efeitos de temperatura, agitação, força iônica e pH para adsorção destes analitos na fibra e posterior derivatização para finalmente a identificação destes compostos por GC.

Após a otimização preliminar do método o mesmo será validado com os mesmos parâmetros de validação utilizados em HPLC (linearidade, faixa linear, seletividade, precisão, precisão instrumental, intermediária, exatidão, robustez).

Através dos testes iniciais com GC pode-se chegar a alguns resultados preliminares quando comparado a HPLC. Por exemplo o tempo total de análise em GC é de 35 minutos e em HPLC 28 minutos. O método desenvolvido em GC apresenta melhor resolução, alta sensibilidade, requer pouca amostra quando comparado com HPLC, que é um método que exige experiência e analista treinado para sua utilização e manutenção, além de ser um método que utiliza solventes para análises gerando resíduos.

6 CONCLUSÃO

O método proposto para a determinação dos produtos da reação de oxidação do glicerol por HPLC apresentou bons resultados para a determinação simultânea dos produtos da reação de oxidação do glicerol testados, sendo possível identificar, separar e quantificar simultaneamente 08 produtos da reação em 28 minutos de análise.

A metodologia foi validada através da área e altura do pico. As curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação $\geq 0,9978$. A metodologia proposta mostrou-se sensível e precisa para a faixa de concentração adotada de 1,3 a 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na precisão avaliada através da precisão instrumental, precisão intermediária e repetitividade foram obtidos valores de $\text{CV} \leq 9,34\%$. A exatidão do método apresentou valores de recuperação de 89 a 108% tanto na amostra real como na matriz fortificada pelos padrões. O método proposto é robusto para pequenas variações de temperatura ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$).

O método proposto por GC com derivatização dos analitos, apresentou o tempo total de análise de 35 minutos, sendo 15 minutos para a realização da reação de derivatização mais 20 minutos para análise cromatográfica. O método foi preliminar sendo necessárias ainda várias otimizações para que o mesmo possa ser usado de forma rotineira, por exemplo, deve ser estudada uma maneira de extração dos analitos do meio aquoso para futura análise em GC.

7 PERSPECTIVAS

Método analítico desenvolvido em GC

- No método proposto por GC ainda serão realizados pequenos ajustes de forma a separar a coeluição de padrões (gliceraldeído e ácido glicólico), bem como melhorar a separação dos padrões de ácido acético e ácido fórmico dos picos referentes aos solventes. Estes ajustes podem ser realizados modificando a rampa de aquecimento da coluna.
- Em GC ainda será necessário o estudo de técnicas de extração dos analitos do meio reacional (aquoso) e posterior derivatização dos compostos.

REFERÊNCIAS

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J.C.; CUSTODIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração (2000). <http://www.chemkeys.com>, acessada em setembro, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Boletim Mensal de Biodiesel - Janeiro de 2016. <http://www.anp.gov.br/?id=472> [acessado 24.01.16].

AHMADI-JOUIBARIA, T.; SHAMSIPURC, M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 94, p.145–151, 2014.

ALBANO, F.M.; RAYA-RODRIGUES, M.T. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais- Guia Prático. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009.

ANDRADE, F.I. et al. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. **Food Chemistry**, 157, p.193–198, 2014.

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, p.2476-2481, 2009.

AYOUB, M E ABDULLAH, A, Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16, p.2671–2686, 2012.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p.306-319, 2011.

BÉLTRAN-PRIETO, J.C. et al. Development of an HPLC Method for the Determination of Glycerol Oxidation Products. **Journal of Liquid Chromatography et Related Technologies**, p.2758-2773, 2013.

BICKER, M. et al. Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. **Journal of Molecular Catalysis A Chemical**, v. 239, p.151–157, 2005.

BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 13, p.129-146, 2003.

CAI, J. et al. Catalytic oxidation of glycerol to tartronic acid over Au/HY catalyst under mild conditions. **Chinese Journal of Catalysis**, p.1653–1660, 2014.

CARRILHO, Emanuel. Isolamento e Purificação de Biomoléculas. Conselho Federal de Biologia, [2015], 201 slides, color.

CAVALHEIRO, A.C.V.; MORAES, M.; PEZZA, L. Construção e aplicação físico-química de um eletrodo de segunda espécie, sensível ao íon oxalato, em meio aquoso. **Eclética Química**, v.25,p.123-135, 2000.

CHEN, H.; FANG, B.; HU, Z. Simultaneous HPLC Determination of Four Key Metabolites in the Metabolic Pathway for Production of 1, 3-Propanediol from Glycerol. **Chromatographia**, 65 (9-10), p.629-632, 2007.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p.623-636, 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, São Paulo, Editora UNICAMP, 2006.

DAN, L. et al. Glycerol Oxidation with Oxygen over Bimetallic Pt-Bi Catalysts under Atmospheric Pressure. **Chinese Journal of Catalysis**, 32: p.1831–1837, 2011.

DÍAZ-ÁLVAREZ, A.E.; CADIerno, V. Glycerol: A promising Green Solvent and Reducing Agent for Metal-Catalyzed Transfer Hydrogenation Reactions and Nanoparticles Formation. **Applied Sciences**, 3, p.55-69, 2013.

DIMITRATOS, N.; PORTA, F.; PRATI, L. Au, Pd (mono and bimetallic) catalysts supported on grafite using the immobilisation method synthesis and catalytic testing for liquid phase oxidation of glycerol. **Applied Catalysis A: General**, 291, p.210–214, 2005.

DUSSELIER, M. et al. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. **Energy & Environmental Science**, 6, p.1415–1442, 2013.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington. 2014. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf > Acesso em: 06 ago. 2015.

FENG, Y. et al. Selectively catalytic oxidation of 1,2 propanediol to lactic, formic, and acetic acids over Ag nanoparticles under mild reaction conditions. **Journal of Catalysis**, 326, p.26–37, 2015.

GARCIA, R.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals. **Applied Catalysis A: General**, 127, p.165-176, 1995.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, p. 1-21, 2003.

HARRIS, DANIEL C. Análise Química Quantitativa, 7ª Edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro-RJ, 2008.

HÄRTER, A.P.G. et al. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocapsulas poliméricas por cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 37, p.996-999, 2014.

HEKMAT, D.; BAUER, R.; FRICKE, J. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, 109-116, 2003.

HIRASAWA, S. et al. Performance, structure and mechanism of Pd–Ag alloy catalyst for selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone. **Journal of Catalysis**, 300, p.205–216, 2013.

HU, Q. et al. Determination of trace lead, cadmium and mercury by on-line column enrichment followed by RP-HPLC as metal-tetra-(4-bromophenyl)-porphyrin chelates. **Talanta**, 57, p.751–756, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

KATAOKA, M. et al. Glycolic Acid Production Using Ethylene Glycol Oxidizing Microorganisms. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 65, p.2265–2270, 2001.

KETCHIE, W.C. et al. Influence of gold particle size on the aqueous-phase oxidation of carbon monoxide and glycerol. **Journal of Catalysis**, 250, p.94–101, 2007.

KIMURA, H. Selective oxidation of glycerol on a platinum-bismuth catalyst by using a fixed bed reactor. **Applied Catalysis A: General**, 105, p.147-158, 1993.

KIMURA, H.; TSUTO, K. Selective Oxidation of Glycerol on a Platinum-Bismuth Catalyst. **Applied Catalysis. A**, 96 (2), p.217-228. 1993.

KING, A.G.; WRIGHT, M. W. Rudolph Diesel Meets the Soybean: “Greasing” the Wheels of Chemical Education. **Chemical Education Today**, 84 (2) p.202-206, 2007.

KOROVCHENKO, P. et al. Oxidation of primary alcohols with air on carbon-supported platinum catalysts for the synthesis of aldehydes or acids. **Catalysis Today**, 121, p.13–21, 2007.

LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”? **Scientia Chromatographica**. v.1, p.51-60, 2009.

LANÇAS, F.M. Cromatografia Líquida Moderna. HPLC/CLAE. Campinas, São Paulo, Editora Átomo, 2009.

LEE, H.C. et al. Catalytic performance of cement clinker supported nickel catalyst in glycerol dry reforming. **Journal of Energy Chemistry**, 23, p.645–656, 2014.

LEONETI, A, B.; LEONETI, V.A.; OLIVEIRA, S.V.W.B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, 45, p.138-145, 2012.

LIANG, D. et al. Selective oxidation of glycerol in a base-free aqueous solution over different sized Pt catalysts . **Catalysis Communications**, 10, p.1586–1590, 2009.

MAKI-ARVELA, P. et al. Production of lactic acid/lactates from biomass and their catalytic transformations to commodities, **Chemical Reviews**, 114, p.1909–1971, 2014.

MENGYUAN, Z. et al. Oxidation of Biodiesel Glycerol over Pt Supported on Different Sized Carbon Supports in Base-Free Solution. **Chinese Journal of Catalysis**, 33, p.1340–1346, 2012.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual Química**, v.3, p.416-425, 2011.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.639-648, 2009.

MUSIALSKA, K. et al. Characterization of alumina- and niobia-supported gold catalysts used for oxidation of glycerol. **Applied Catalysis A: General**, 384, p.70–77, 2010.

NING, X. et al. Promoting role of bismuth and antimony on Pt catalysts for the selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone. **Journal of Catalysis**, 335, p.95–104, 2016.

PAGLIARO, M. et al. From Glycerol to Value-Added Products. **Angewandte Chemie International Edition**, 46, p.4434 – 4440, 2007.

PENTEADO, J.C.P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J.C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, v. 31, p.2190-2193, 2008.

PINTO, A.C. et al. Biodiesel: An Overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p.1313-1330, 2005.

PORTA, F.; PRATI, L. Selective oxidation of glycerol to sodium glycerate with gold-on-carbon catalyst: an insight into reaction selectivity. **Journal of Catalysis**, 224, p.397–403, 2004.

RABER, G. et al. An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. **Food Chemistry**, 134, p.524–532, 2012.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual Química**, 3, p.385-405, 2011.

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

RIBEIRO, F.A.L. et al. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p.164-171, 2008.

RODRIGUES, E.G. et al. Gold supported on carbon nanotubes for the selective oxidation of glycerol. **Journal of Catalysis**, 285, p.83–91, 2012.

RODRIGUES, E.G. et al. Influence of activated carbon surface chemistry on the activity of Au/AC catalysts in glycerol oxidation. **Journal of Catalysis**, 281, p.119–127, 2011.

RODRIGUEZ, A. A.; WILLIAMS, C.T.; MONNIER, J.R. Selective liquid-phase oxidation of glycerol over Au–Pd/C bimetallic catalysts prepared by electroless deposition. **Applied Catalysis A: General**, 475, p.161–168, 2014.

ROQUET, L. et al. Kinetics and mechanisms of the electrocatalytic oxidation of glycerol as investigated by chromatographic analysis of the reaction products: potential and ph effects. **Electrochimica Acta**, 39, p.2387-2394, 1994.

SCHUMMER, C. et al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, 77, p.1473–1482, 2009.

SHELDON, R.A. Recent advances in green catalytic oxidations of alcohols in aqueous media, **Catalysis Today**, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2014.08.024>.

SHEN, Y.; LI, Y.; LIU, H. Base-free aerobic oxidation of glycerol onTiO₂-supported bimetallic Au–Pt catalysts. **Journal of Energy Chemistry**, 24, p.669–673, 2015.

SKRZYNSKA, E. et al. Crude glycerol as a raw material for the liquid phase oxidation reaction. **Applied Catalysis A: General**, 482, 245–257, 2014.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Transformação de triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na Oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.667-676, 2007.

UMPIERRE, A.P.; MACHADO, F. Gliceroquímica e Valorização do Glicerol. **Revista Virtual Química**, 5(1), p.106-116, 2012.

VILLA, A. et al. Au on MgAl₂O₄ spinels: The effect of support surface properties in glycerol oxidation. **Journal of Catalysis**, 275, p.108–116, 2010.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends Analytical Chemistry**, 18, p.624-632, 1999.

ZHANG, M. et al. Selective oxidation of glycerol over carbon nanofibers supported Pt catalysts in a base-free aqueous solution. **Catalysis Communications**, 59, p.5–9, 2015.

ZHANG, M. et al. Selective oxidation of glycerol over nitrogen-doped carbon nanotubes supported platinum catalyst in base-free solution. **Catalysis Communications**, 70, p.72–76, 2015.

ZHENG, Y.; CHEN, X.; SHEN, Y. Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feed stock. **Chemical Reviews**, 108, p.5253-5277, 2008.

ZHOU, C.C. et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, 37, p.527-549, 2008.