



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E  
AMBIENTAL - PPGQTA**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICEROL LIVRE  
E TOTAL, MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS EM  
BIODIESEL ETÍLICO DE GIRASSOL, MAMONA E DA  
MISTURA DE SEBO E SOJA EMPREGANDO GC-FID**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

*Adriana Neves Dias*

**Rio Grande - RS, Brasil  
2010**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICEROL LIVRE E  
TOTAL, MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS EM BIODIESEL  
ETÍLICO DE GIRASSOL, MAMONA E DA MISTURA DE SEBO  
E SOJA EMPREGANDO GC-FID**

**por**

**Adriana Neves Dias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

**Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**  
**Co-orientadores: Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Scherer Kurz**  
**Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca**

Rio Grande, RS, Brasil

**2010**

**Universidade Federal do Rio Grande - FURG**  
**Escola de Química e Alimentos - EQA**  
**Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental -**  
**PPGQTA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICEROL LIVRE E TOTAL,  
MONO-, DI E TRIGLICERÍDEOS EM BIODIESEL ETÍLICO DE  
GIRASSOL, MAMONA E DA MISTURA DE SEBO E SOJA  
EMPREGANDO GC-FID**

elaborada por  
**Adriana Neves Dias**

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

**Comissão Examinadora**

---

**Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**  
(Orientador - Presidente)

---

**Prof. Dr. Eder Lenardão (UFPel)**

---

**Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani (FURG)**

Rio Grande, 29 de março de 2010.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, muita obrigada! Por mais esta oportunidade, o seu incentivo foi fundamental, foram muitas as aprendizagens. Começou na monitoria da disciplina de Química Analítica, continuou em atividades de Iniciação Científica. E nesses dois anos de mestrado, sob sua orientação, não faltaram esforços para uma boa formação, incentivos para participações em congressos e cursos de aperfeiçoamento. Além de tudo sempre pude contar com sua compreensão e amizade.

Ao **Prof. Dr. Eder Lenardão** pela participação na defesa da dissertação, e pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo.

A **Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Scherer Kurz** minha grande amiga e co-orientadora, por todos os ensinamentos que foram dos mais simples aos mais complexos, pelo acompanhamento de cada etapa deste trabalho, pela sua dedicação e pelos muitos momentos de descontração. Pela participação e sugestões no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca** pela co-orientação, pela colaboração com diversas contribuições ao longo desses dois anos, por não medir esforços em trazer cursos de aperfeiçoamento. Pela participação e sugestões no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani** pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da dissertação, e pelos ensinamentos enquanto professor.

Aos meus pais, **Ademoar e Amélia** (in memoriam), palavras não bastam para agradecer as duas pessoas mais especiais da minha vida, aquelas que me ensinaram valores, me deram muito amor, apoio e se esmeraram ao máximo para que eu tivesse uma boa formação profissional. Amo muito vocês. Mãe teu último pedido está realizado!

Ao meu irmão, **Airton**, por seu apoio incondicional, pelo seu amor e ombro amigo de sempre. Te amo muito!

A minha cunhada, **Ester**, pela sua amizade e por estar comigo no momento mais difícil da minha vida. Obrigada!

A minha vó, **Flora**, pela sua sabedoria de 94 anos, pelos seus mimos e amor sempre oferecidos.

Aos meus amigos, **Ângela e Aldino**, que me acolhem há seis anos, por suportarem a convivência diária comigo! Pela amizade, muitas rodas de chimarrão e por sempre torcerem por mim.

A minha grande amiga e colega, **Sherol**, com certeza tudo se torna mais fácil quando temos amigos como você que podemos contar sempre! Obrigada pelos muitos momentos divididos: tristezas, alegrias, angústias, trabalhos, provas, estágio docência, congressos.

As minhas queridas amigas, **Alexandra e Daniele**, por vocês se fazerem sempre presentes, por nossas vitórias, alegrias e tristezas compartilhadas.

A minha amiga, **Sergi**, pelo seu incentivo e torcida para o meu ingresso no curso de mestrado. Pelas experiências e ensinamentos compartilhados e principalmente pela sua amizade, apoio, carinho e por você sempre se fazer presente.

A minha amiga, **Lizi**, pelo seu incentivo e torcida para o meu ingresso no curso de mestrado. Companheira de viagem ao melhor congresso que eu já fui, ENQA-Salvador-Ba, de beberagens e de momentos de desconstrução. Pelas aprendizagens, pelo seu carinho e amizade.

A minha amiga, **Ana Laura**, pelo seu incentivo e torcida para o meu ingresso no curso de mestrado. Pelos ensinamentos nas atividades de Iniciação Científica e pelas muitas horas de trabalho compartilhadas e risadas fazendo titulações!

A minha amiga, **Adri Demoliner**, pelo seu incentivo e torcida para o meu ingresso no curso de mestrado. Pelas muitas palavras de incentivo e pela sua alegria contagiante. Você fez falta nesse ano de 2009 no LACOM, obrigada!

A minha amiga, **Maristela**, por estar sempre disposta a ajudar e pelas nossas discussões e aprendizagens.

Ao **Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves**, pela amizade e disposição em ajudar de sempre.

Aos meus colegas do LACOM com os quais convivi, e que contribuíram de diversas formas, tenho um carinho muito grande por todos. **Márcia, Sherol, Sergi, Lizi, Débora, Liziane, Maicon, Adri Demoliner, Ana Laura, Ednei, Fábio, Luis, Maristela, Cátia, Nathiele, Fabi, Vivi, Flávio e Ana Raisa.** Agradeço também aos “**associados**” do LACOM!

Aos **colegas dos Laboratórios de Química Orgânica**, que realizaram a síntese das amostras de biodiesel para a realização deste estudo.

Aos **colegas do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, pelos momentos vividos durante o decorrer desses dois anos.

À **FURG** pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

À **CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental** por me oportunizar duas bolsas de estudo!

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica, proporcionando-me esta realização e formação com qualidade.

Agradeço à **Deus**, por ter me pegado no colo nos momentos difíceis, pela coragem, proteção e por me conceder esta vitória.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICEROL LIVRE E TOTAL, MONO-, DI- E  
TRIGLICERÍDEOS EM BIODIESEL ETÍLICO DE GIRASSOL, MAMONA E DA  
MISTURA DE SEBO E SOJA EMPREGANDO GC-FID  
AUTORA: ADRIANA NEVES DIAS  
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL  
Rio Grande, 29 de março de 2010

O biodiesel produzido para ser comercializado no Brasil deve estar de acordo aos padrões de qualidade estabelecidos pela resolução de 4 de fevereiro de 2010 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e do Biocombustível (ANP, 04/2010). Neste trabalho, foi estudada a aplicação dos métodos ASTM D 6584 e EN 14105 para o biodiesel de mamona e biodiesel oriundo de rota etílica. Ambos os métodos empregam GC (Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*) com FID (Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*) e reação de sililação com *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoracetamida (MSTFA). Os compostos foram identificados para quantificação pelos tempos de retenção, para os diglicerídeos e triglicerídeos foram utilizadas bandas de tempo de retenção. Os parâmetros de validação considerados foram: curva analítica, linearidade, sensibilidade, robustez, precisão e exatidão. Os métodos ASTM D 6584 e EN 14105 apresentaram sensibilidade semelhante para todos os compostos. Foram escolhidas as condições cromatográficas estabelecidas pelo método ASTM D 6584 por ser mais rápido que o EN14105 e ter sensibilidade semelhante. O método apresentou boa linearidade com todas as curvas analíticas com *r* maiores que 0,999. A reação de sililação com MSTFA foi otimizada para o biodiesel etílico de mamona em virtude da sua composição química. Um volume de 500 µL de MSTFA foi escolhido para realização dos ensaios de exatidão e precisão. Os valores de exatidão ficaram entre 67 e 145,9% com valores de precisão menores que 11%. Foi avaliada a ocorrência de efeito matriz para biodiesel etílico de mamona, sendo que esse efeito foi considerado baixo para glicerol, monooleína e dioleína e médio para trioleína. Mesmo havendo efeito de matriz o preparo das curvas analíticas em solvente conforme sugerido pelos métodos de referência foi mantido. O método foi robusto frente às variações da composição química da matriz. Na aplicação do método, esse se mostrou adequado para amostras de biodiesel etílico de mamona, de girassol e da mistura de sebo e soja.

Palavras-chave: biodiesel etílico; mamona; girassol; sebo e soja; glicerol; glicerídeos; GC-FID

## ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FREE AND TOTAL GLYCEROL, MONO-, DI- AND TRIGLYCERIDES IN ETHYLIC BIODIESEL OF SUNFLOWER, CASTOR OIL AND TALLOW/SOYBEAN MIXTURE USING GC-FID

AUTHOR: ADRIANA NEVES DIAS

ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.

March 29<sup>th</sup>, 2010, Rio Grande,RS

The biodiesel produced to be marketed in Brazil should be according to the quality standards established by the Resolution of February 4, 2010 of the Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e do Biocombustível (ANP, 04/2010). In this work, the application of the methods ASTM D 6584 e EN 14105 for castor oil biodiesel and biodiesel from ethylic routes was studied. Both the methods use Gas Chromatography with Flame Ionization Detection and silylation reaction with *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA). The compounds were identified by the retention times, and for di- and triglycerides were used bands of retention time. The validation parameters were: analytical curve, linearity, sensibility, robustness, precision and accuracy. The methods ASTM D 6584 e EN 14105 showed similar sensitivity for all the compounds. The chromatographic conditions established by the method ASTM D 6584 were chosen because it is faster than the method EN14105. The method presented good linearity with *r* greater than 0,999 for all analytical curves. The silylation reaction was optimized for the ethylic castor biodiesel because of its different chemical composition. A volume of 500 µL of MSTFA was chosen for the realization of the precision and accuracy assays. The accuracy values were between 67.0 and 145.9% with precision values lower than 11%. The matrix effect occurrence for ethylic castor oil biodiesel was evaluated. The effect was considered low for glycerol, mono- and diolein and it was considered media for triolein. But, the analytical curves were prepared in solvent even though the matrix effect. The method was robust regarding variations of the matrix chemical composition. In the application of the method, this proved to be suitable to the samples of ethylic biodiesel of castor oil, sunflower and tallow/soybean mixture.

Key words: ethylic biodiesel, castor oil, sunflower, tallow/soybean, glycerol, glycerides, GC-FID



## Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismo de transesterificação ácida .....	9
Figura 2 – Mecanismo de transesterificação básica.....	9
Figura 3 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do diesel .....	13
Figura 4 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do biodiesel .....	13
Figura 5 – Produção de biodiesel no Brasil de 01/2005 a 09/2009 (Fonte: ANP, 2009)	14
Figura 6 – Produção de biodiesel por região no ano de 2007 (Fonte: MDIC, 2006) .....	15
Figura 7 – Produção de biodiesel no Rio Grande do Sul de 01/2007 a 09/2009 (Fonte: ANP, 2009).....	16
Figura 8 – Representação da reação de silição para análise de glicerol e glicerídeos	27
Figura 9 – Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas moleculares .....	34
Figura 10 – Modelo de curva utilizado no método de adição padrão .....	54
Figura 11 – Em rosa pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (referência) e preto pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (biodiesel de mamona derivatizado com 100 µL de MSTFA) .....	58
Figura 12 – Em rosa pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (referência) e preto pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (biodiesel de mamona derivatizado com 500 µL de MSTFA) .....	59
Figura 15 – Perfil cromatográfico da composição química do biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80).....	62
Figura 16 – Perfil cromatográfico do biodiesel etílico da mistura de sebo e soja (20/80%) nas condições de análise do método EN 14105 (em preto) e do método ASTM D 6584 (em rosa) .....	64
Figura 17 – Perfil cromatográfico do biodiesel etílico de mamona nas condições de análise do método EN 14105 (em preto) e do método ASTM D 6584 (em rosa) .....	64
Figura 18 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da mistura dos padrões dos monoglicerídeos sob as condições de análise do método ASTM D 6584 .....	65
Figura 19 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da mistura dos padrões dos monoglicerídeos em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584.....	66

Figura 20 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da mistura dos padrões dos monoglicerídeos em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico de mamona em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584.....	67
Figura 21 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da dioleína em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584..	68
Figura 22 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da dioleína em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico de mamona em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584 .....	69
Figura 23 – Dímero formado por ésteres etílicos de ricinoleato .....	70
Figura 24 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da trioleína em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico da mistura de sebo e soja (20:80) em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584 .....	70
Figura 25 - Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da trioleína, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico de mamona em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584 .....	71
Figura 26 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração dos padrões.....	72
Figura 27 – Perfil cromatográfico da amostra de biodiesel etílico de mamona derivatizada com 500 µL de MSTFA .....	72
Figura 28 – Perfil cromatográfico da região de monoglicerídeos da amostra de biodiesel etílico de mamona .....	73
Figura 29 – Perfil cromatográfico da região de diglicerídeos da amostra de biodiesel etílico de mamona .....	73
Figura 30 – Espectro de massas m/z de 70 a 400 para monoricinoleína derivatizada com MSTFA .....	74
Figura 31 – Espectro de massas m/z de 70 a 400 para estólido derivatizado com MSTFA .....	74
Figura 32 – Espectro de massas m/z de 70 a 400 para estólido derivatizado com MSTFA .....	75
Figura 33 – Espectro de massas m/z de 70 a 400 para 1,3-diricinoleína derivatizada com MSTFA .....	75
Figura 34 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da mistura dos padrões sob as condições de análise do método ASTM D 6584 .....	77
Figura 35 – Curvas analíticas do glicerol no solvente e na matriz.....	82
Figura 36 – Curvas analíticas da monooleína no solvente e na matriz .....	83
Figura 37 – Curvas analíticas da dioleína no solvente e na matriz .....	83
Figura 38 – Curvas analíticas da trioleína no solvente e na matriz .....	84

Figura 39 – Perfil cromatográfico da amostra de biodiesel etílico de mamona analisada .....	89
---	----

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação das propriedades físicas e químicas do diesel N°2* e do biodiesel .....	12
Tabela 2 - Composição de ácidos graxos no óleo de girassol .....	18
Tabela 3 - Composição de ácidos graxos no óleo de mamona.....	20
Tabela 4 - Composição de ácidos graxos no óleo de soja .....	21
Tabela 5 - Composição de ácidos graxos do sebo bovino .....	22
Tabela 6 – Métodos de referência para análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicérides no biodiesel de acordo com os padrões ANP 04/2010, ASTM D 6751e EN 14214 .....	24
Tabela 7 - Limites máximos de resíduos permitidos para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicérides no biodiesel de acordo com os padrões ANP 04/2010, ASTM D 6751e EN 14214 .....	25
Tabela 8 – Preparo das soluções estoque .....	46
Tabela 9 – Volumes, em $\mu\text{L}$ , das soluções estoque para preparo das curvas analíticas de cada composto .....	46
Tabela 10 – Níveis de concentração, % (m/m), para os compostos segundo ASTM D 6584 .....	52
Tabela 11 - Relação de áreas dos compostos nas Figuras 13 e 14.....	60
Tabela 12 - Composição graxa do biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80).....	62
Tabela 13 – Resultados de linearidade e curva analítica de cada composto no método .....	76
Tabela 14 – Tempos de retenção ( $t_R$ ) e áreas dos compostos na Figura 34.....	77
Tabela 15 – Equação da reta para cada composto nos métodos: ASTM D 6584 e EN 14105 para avaliação da sensibilidade .....	77
Tabela 16 – Precisão instrumental ( $RSD_i$ ) para os compostos nos níveis de concentração da curva analítica.....	78
Tabela 17 – Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos no biodiesel etílico de mamona em diferentes níveis considerando os padrões internos.....	79
Tabela 18 – Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos no biodiesel etílico de mamona em diferentes níveis sem considerar os padrões internos.....	80

Tabela 19 – Recuperação (%) e RSD (%) do método para a trioleína no biodiesel etílico de mamona em diferentes níveis .....	81
Tabela 20 – Efeito matriz (%) para os compostos calculado a partir das inclinações das curvas analíticas no solvente e na matriz.....	84
Tabela 21 – Recuperação (%) do método para a trioleína calculada pelas curvas na matriz e no solvente .....	85
Tabela 22 – Tempos e bandas de retenção utilizados para identificação e quantificação dos compostos .....	86
Tabela 23 – Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos nas amostras analisadas.....	87
Tabela 24 – Tempos de retenção ( $t_R$ ) e as áreas para os compostos na Figura 32.....	89

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Estruturas e informações químicas para glicerol livre, mono-, di-triglicérides e padrões internos (S) - (-) -1,2,4- butanotriol e tricaprina .....	101
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- ASTM – American Society for Testing and Materials
- BSTFA - *N,O-Bis-(trimetilsilil)trifluoracetamida*
- CAS – *Chemical Abstracts Service*
- DD - Detecção por Densidade do inglês *Density Detection*
- DMDCS - Dimetildiclorossilano
- E - Exatidão
- EI – Impacto de elétrons, do inglês *Electron Impact*
- EUA – Estados Unidos da América
- eV – elétron-Volt
- EN – European Standard
- ELSD - Detecção por Dispersão de Luz por Evaporação, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*
- ESI - Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*
- FID – Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*
- FURG – Universidade Federal do Rio Grande
- FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GPC - Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

ICH - International Conference on Harmonization  
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry  
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial  
ISO - International Standard Organization  
LACOM – Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais  
LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas *tandem*  
Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*  
MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*  
MSTFA – *N*-Metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida  
MTBSTFA – *N*-(*t*-Butildimetilsilil)-*N*-trifluoroacetamida  
*m/z* – razão massa-por-carga  
NBR - Denominação de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
OCLLE - Extração Líquido-Líquido em Coluna, do inglês *On-column Liquid-liquid Extraction*  
PAD - Detecção Amperométrica Pulsada, do inglês *Pulsed Amperometric Detection*  
PDA - Detecção por Arranjo de Fotodiodos, do inglês *Photodiode Array Detector*  
*r* - Coeficiente de *Pearson*  
*R* – Recuperação  
RF – Fator de correção  
RID - Detecção por Índice de Refração, do inglês *Refractive Index Detection*  
RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*  
*s* – estimativa do desvio padrão absoluto  
SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*  
TFAA - Anidrido trifluoracético  
TLC - Cromatografia de Camada Fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*  
TMCS – Trimetilclorosilano  
TMSI – *N*-trimetilsililimidazol  
*t<sub>R</sub>* – tempo de retenção  
UV - Detecção no Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Detector*  
*x<sub>m</sub>* – média de medidas em réplica



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Processos para utilização de óleos vegetais e gorduras animais como combustíveis</b> .....	<b>5</b>
3.1.1	Diluição dos óleos vegetais.....	6
3.1.2	Pirólise termal e pirólise catalítica.....	6
3.1.3	Microemulsão.....	7
3.1.4	Transesterificação.....	7
3.1.5	Métodos enzimáticos, glicerólises e esterificação.....	10
<b>3.2</b>	<b>Biodiesel</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Produção e uso de biodiesel</b> .....	<b>13</b>
3.3.1	Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel .....	17
3.3.1.1	Girassol.....	17
3.3.1.2	Mamona.....	18
3.3.1.3	Soja.....	20
3.3.1.4	Sebo bovino .....	21
<b>3.4</b>	<b>Análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel</b>	<b>22</b>
3.4.1	Estruturas e informações químicas (ANEXO A).....	23
3.4.2	Métodos de referência e os limites máximos de resíduos .....	23
3.4.3	Reação de sifilação .....	25
3.4.4	Outros métodos para análise de glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel .....	28
<b>3.5</b>	<b>Cromatografia Gasosa</b> .....	<b>32</b>
3.5.1	Detecção por Ionização em Chama.....	33
3.5.2	Espectrometria de Massas.....	33
<b>3.6</b>	<b>Validação de métodos cromatográficos</b> .....	<b>35</b>

3.6.1	Curva analítica e linearidade.....	36
3.6.1.1	Padronização interna.....	37
3.6.2	Precisão.....	37
3.6.3	Exatidão.....	39
3.6.4	Sensibilidade.....	40
3.6.5	Robustez.....	40
<b>3.7</b>	<b>Efeito matriz .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Instrumentação .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes, solventes e materiais.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções analíticas .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4</b>	<b>Amostras de biodiesel.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Preparo das amostras para determinação da composição química do biodiesel da mistura de sebo e soja .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6</b>	<b>Otimização da reação de sililação para o biodiesel etílico de mamona.</b>	<b>47</b>
<b>4.7</b>	<b>Composição química do biodiesel etílico da mistura de sebo e soja (20/80%).....</b>	<b>48</b>
<b>4.8</b>	<b>Sistema cromatográfico GC-FID.....</b>	<b>49</b>
<b>4.9</b>	<b>Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos .....</b>	<b>49</b>
4.9.1	GC-MS para confirmação dos compostos .....	50
<b>4.10</b>	<b>Cálculo para quantificação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel .....</b>	<b>51</b>
<b>4.11</b>	<b>Validação do método.....</b>	<b>51</b>
4.11.1	Curva analítica e linearidade.....	52
4.11.2	Sensibilidade.....	52
4.11.3	Precisão.....	53
4.11.4	Exatidão.....	53
4.11.5	Robustez.....	55
<b>4.12</b>	<b>Avaliação do efeito matriz.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Otimização da reação de sililação para o biodiesel etílico de mamona.</b>	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação da composição química do biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3</b>	<b>Condições cromatográficas escolhidas para análise das amostras.....</b>	<b>63</b>

<b>5.4</b>	<b>Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos .....</b>	<b>65</b>
5.4.1	GC-MS para confirmação dos compostos .....	71
<b>5.5</b>	<b>Validação do método .....</b>	<b>76</b>
5.5.1	Curva analítica e linearidade.....	76
5.5.2	Sensibilidade.....	77
5.5.3	Precisão .....	78
5.5.4	Exatidão.....	79
5.5.5	Robustez.....	82
<b>5.6</b>	<b>Efeito matriz .....</b>	<b>82</b>
<b>5.7</b>	<b>Resumo do método utilizado para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura de sebo e soja.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Aplicação do método.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO.....</b>	<b>100</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis são essenciais para atividades humanas como: produção agrícola, produção industrial e transporte; com isso, estão diretamente relacionados com a economia. Portanto, os combustíveis são imprescindíveis à vida do homem. A previsão de esgotamento do petróleo, principal fonte de combustível mundial, ameaça a produção dos seus derivados como a gasolina e o diesel, gerando incentivos para a produção de biocombustíveis alternativos como o etanol e o biodiesel.

Aliado ao esgotamento, há as questões ambientais no que se refere às emissões liberadas na queima dos combustíveis oriundos do petróleo. Essas emissões são consideradas as maiores agressoras do meio ambiente atualmente. Os biocombustíveis, com origem na biomassa, apresentam vantagem com relação à diminuição da emissão de compostos considerados tóxicos, como hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos, dióxido de carbono (devido a participação no ciclo do carbono), dentre outros. Além do que, os biocombustíveis são biodegradáveis.

O Brasil, pelas suas condições de solo e clima, se destaca na produção mundial de biocombustíveis estando em crescente desenvolvimento. Para a produção de biodiesel há uma ampla diversidade de oleaginosas incluindo: soja, mamona, girassol entre outras; destacando também a produção de biodiesel a partir da gordura bovina, a qual é a segunda maior fonte de matéria-prima do país para a obtenção de biodiesel, depois da soja. A produção de biodiesel no país via rota etílica vem ganhando cada vez mais espaço, pelo fato do etanol no Brasil ter grande disponibilidade a partir da biomassa.

A fim de garantir um bom funcionamento nos motores a diesel, um controle de qualidade é necessário para o biodiesel produzido. Vários parâmetros são exigidos pelas normas que regulam a qualidade desse produto. A avaliação dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos após o processo de transesterificação são os principais indicadores da qualidade do biodiesel.

Existem métodos de referência estabelecidos para análise desses contaminantes. No Brasil, esses métodos são indicados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e do Biocombustível (ANP), nos Estados Unidos da América

(EUA) pela American Society for Testing and Materials (ASTM) e na União Europeia pela European Standard (EN).

Os métodos ABNT NBR 15341 e EN 14106 são estabelecidos para determinação de glicerol livre em qualquer biodiesel. O método ABNT NBR 15342 é indicado para análise de mono- e diglicerídeos em biodiesel de mamona. O método ABNT NBR 15344 é indicado para determinação de glicerol total no biodiesel de mamona, e caso os métodos ABNT NBR 15341 e ABNT NBR 15342 sejam aplicados é possível determinar o conteúdo de triglicerídeos. Já os métodos ASTM D 6584 e EN 14105 são indicados para quantificação simultânea dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel metílico oriundo de óleo de colza, girassol, soja ou ésteres metílicos de composição semelhante a esses. Todos os métodos anteriormente citados empregam GC (Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*) com detector FID (Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*), com exceção do método ABNT NBR 15344, que emprega a iodometria.

Para a avaliação dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de mamona é necessária a utilização de três métodos distintos: ABNT NBR 15341, ABNT NBR 15342 e ABNT NBR 15344; sendo o último um método clássico. Baseado nisso, se torna importante o estudo analítico da aplicação dos métodos ASTM D 6584 e EN 14105 ao biodiesel de mamona, pois com esses é possível a determinação simultânea dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos. Para tal é necessário uma otimização da reação de silição utilizada por esses métodos.

Além disso, esse estudo analítico amplia a gama de amostras para as quais os métodos ASTM D 6584 e EN 14105 são aplicáveis, incluindo biodiesel de mamona com uma composição química distinta das amostras para as quais esses métodos são indicados e biodiesel da mistura de sebo:soja (20:80) a qual apresenta composição semelhante. Essa ampliação se dá também no que se refere à aplicação desses métodos a biodiesel produzido via rota etílica, pois as amostras de biodiesel que compõem o estudo são: biodiesel etílico de girassol, biodiesel etílico de mamona e biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20/80).

É ressaltada a importância deste trabalho no âmbito da produção nacional porque inclui como amostras possíveis de serem analisadas pelos métodos ASTM D 6584 e EN 14105 o biodiesel de mamona e biodiesel etílico, ou seja, colabora para

atender a necessidade de métodos que sejam adequados às matérias-primas características do Brasil, para a produção de biodiesel.

## 2 OBJETIVOS

### **Geral**

❖ Determinação simultânea de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel etílico de girassol, mamona, e da mistura de sebo e soja empregando GC-FID.

### **Específicos**

- ❖ Otimizar a reação de silição para o biodiesel etílico de mamona;
- ❖ Testar a influência de aquecimento de temperatura mais brando (EN 14105) e mais rápido (ASTM D 6584) na separação de ésteres, mono-, di- e triglicerídeos em amostras de biodiesel etílico de mamona e da mistura de sebo e soja
- ❖ Validar o método, considerando: curva analítica, linearidade, precisão, exatidão e robustez;
- ❖ Comparar a sensibilidade dos métodos ASTM D 6584 e EN 14105;
- ❖ Avaliar o efeito matriz na amostra de biodiesel etílico de mamona;
- ❖ Aplicar o método para amostras de biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura de sebo e soja produzidas nos laboratórios de Química Orgânica da FURG;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Processos para utilização de óleos vegetais e gorduras animais como combustíveis

O interesse no uso de combustíveis renováveis iniciou com o uso direto de óleos vegetais como substituto para o diesel. Há mais de cem anos o inventor do motor diesel Rudolph Diesel realizou os primeiros testes com óleo de amendoim (BALAT e BALAT, 2008). Nas décadas de 1930 e 1940 óleos vegetais foram usados como combustíveis para motores diesel, mas geralmente em situações de emergência.

Os óleos vegetais apresentam injeção, atomização e combustão significativamente diferente do diesel (SRIVASTAVA e PRASADA, 2000). Possuem poder calorífico comparável ao diesel, no entanto a injeção direta deles é restringida devido às propriedades físicas desfavoráveis, principalmente a alta viscosidade (RAMADHAS *et al.*, 2004). A viscosidade dos óleos vegetais é de dez a dezessete vezes maior que a do diesel (DEMIRBAS, 2009). A baixa volatilidade e o caráter poliinsaturado desses óleos também se apresentam como restrições ao uso dos mesmos como combustível. Além do que os motores diesel devem ser modificados para atuarem com óleos vegetais (FUKUDA *et al.*, 2001; DEMIRBAS, 2009).

A alta viscosidade dos óleos vegetais influencia no processo de injeção e leva à pobre atomização dos mesmos. A baixa volatilidade lhes confere alto ponto de fulgor e a ineficiente mistura formada entre o óleo e o ar contribui para a combustão incompleta (SRIVASTAVA e PRASADA, 2000). Como consequência há formação de depósitos no motor e carbonização nos bicos do injetor. A combinação da alta viscosidade e baixa volatilidade dos óleos vegetais provocam mau arranque e atraso na ignição. A oxidação dos óleos, favorecida pelo seu caráter poliinsaturado, forma depósitos sobre os injetores prejudicando a combustão.

Pesquisas têm sido desenvolvidas para produzir derivados de óleos vegetais a fim de superar as restrições de uso dos óleos para garantir que o desempenho desses derivados se aproxime da performance do diesel (SRIVASTAVA e PRASADA, 2000). Processos como diluição dos óleos, pirólise termal, pirólise catalítica, microemulsão e transesterificação foram especialmente desenvolvidos



para reduzir a viscosidade dos óleos (DEMIRBAS, 2009).

Além dos óleos vegetais as gorduras animais também surgiram como substitutas ao diesel, sendo mais recentes as pesquisas relacionadas às gorduras. As gorduras animais são altamente viscosas e, em geral, permanecem sólidas à temperatura ambiente (ÖNER e ALTUN, 2009). A alta viscosidade leva à atomização pobre e combustão incompleta. Os processos que possibilitam de forma eficaz o uso de derivados de gorduras animais em motores diesel são a transesterificação e a emulsificação.

### 3.1.1 Diluição dos óleos vegetais

A diluição dos óleos vegetais pode ser feita com diesel ou etanol puro (SRIVASTAVA e PRASADA, 2000). Algumas pesquisas na literatura relatam que o processo de diluição de óleos vegetais reduz a viscosidade, mas não de maneira eficiente para uso a longo prazo em motores diesel (RAMADHAS *et al.*, 2004).

### 3.1.2 Pirólise termal e pirólise catalítica

Pirólise termal é uma mudança química causada pela aplicação de energia térmica na presença de nitrogênio. Quando se utiliza catalisadores denomina-se pirólise catalítica, processo mais conhecido como craqueamento catalítico. A decomposição térmica de triglicerídeos produz compostos como alcanos, alcenos, alcadienos, aromáticos e ácidos carboxílicos (BALAT e BALAT, 2008). Os produtos da pirólise apresentam baixa viscosidade e alto número de cetano quando comparado os triglicerídeos; aceitáveis quantidades de enxofre, valores de corrosão de cobre, água e sedimentos; mas inaceitáveis em termos de conteúdos de cinzas, resíduos de carbono e ponto de fluidez (SRIVASTAVA e PRASADA, 2000; SHARMA *et al.*, 2008).

Os produtos gerados na pirólise são semelhantes aos derivados do petróleo, ou seja, durante o processo o oxigênio é removido do combustível. Com isso o benefício ambiental de usar um combustível oxigenado é perdido (MA e HANNA, 1999).

### 3.1.3 Microemulsão

Microemulsões de óleos vegetais e de gorduras animais são feitas com solventes como metanol, etanol e 1-butanol. Pode ser definida como um sistema termodinamicamente estável, isotrópico e transparente de dois líquidos imiscíveis e normalmente um ou mais líquidos iônicos ou não-iônicos anfifílicos (são tensoativos que formam colóides ou micelas em solução) (RAMADHAS *et al.*, 2004). Exemplo: microemulsão pela mistura de óleo de soja, metanol e 2-octanol. O 2-octanol é um líquido não-iônico anfifílico que faz a solubilização micelar do metanol no óleo de soja (MA e HANNA, 1999).

Alguns trabalhos que utilizaram microemulsão relataram a redução da viscosidade do combustível, mas foi irregular para uso prolongado. Testes laboratoriais em motores diesel mostraram a formação de depósitos de carbono e combustão incompleta, dentre outros (BALAT e BALAT, 2008).

### 3.1.4 Transesterificação

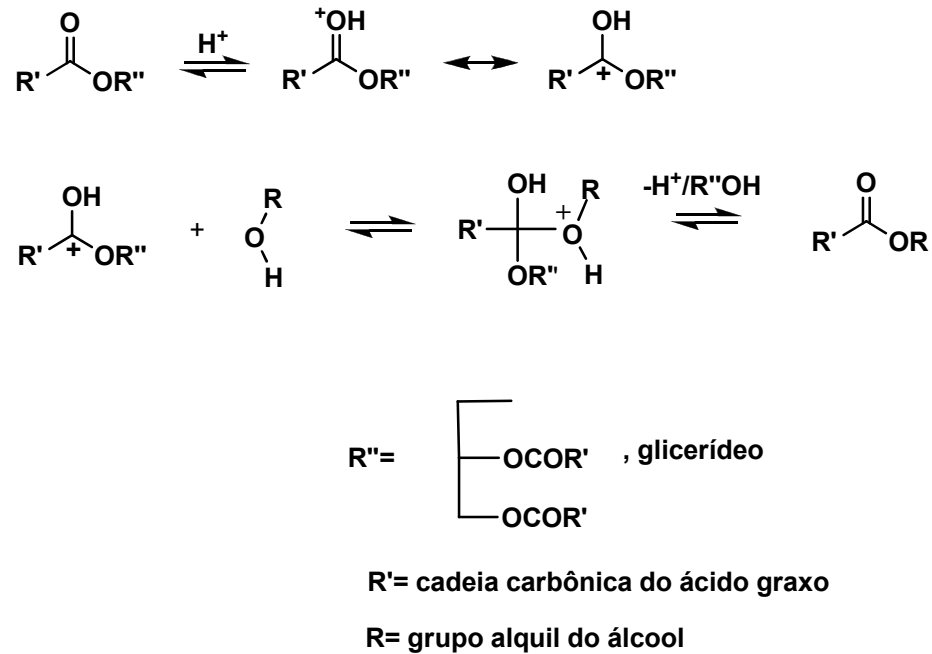
Transesterificação é uma reação química entre uma molécula de triglicerídeo e três moléculas de álcool de cadeia curta com ou sem catalisador formando três moléculas de ésteres de alquila (biodiesel) e uma molécula de glicerol. A transesterificação consiste da seqüência de três reações reversíveis consecutivas onde triglicerídeos são convertidos a diglicerídeos, e estes são convertidos a monoglicerídeos seguido pela conversão de monoglicerídeos a glicerol. Em cada passo um éster é produzido, então três moléculas de ésteres são produzidas a partir de uma molécula de triglicerídeo. Dentre os processos para produção de derivados de óleos ou gorduras com redução na viscosidade, a reação de transesterificação é o mais viável (SHARMA *et al.*, 2008). Além disso, produz como co-produto o glicerol o qual tem valor comercial. Os álcoois que podem ser usados na transesterificação são: metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico (FUKUDA *et al.*, 2001; MA e HANNA, 1999). No entanto, os álcoois efetivamente utilizados são metanol e etanol.

O metanol, por ser mais reativo e ter menor custo, é amplamente utilizado na produção mundial de biodiesel. No Brasil a produção em larga escala de etanol obtido da cana-de-açúcar torna o etanol mais barato que o metanol. Além disso, a

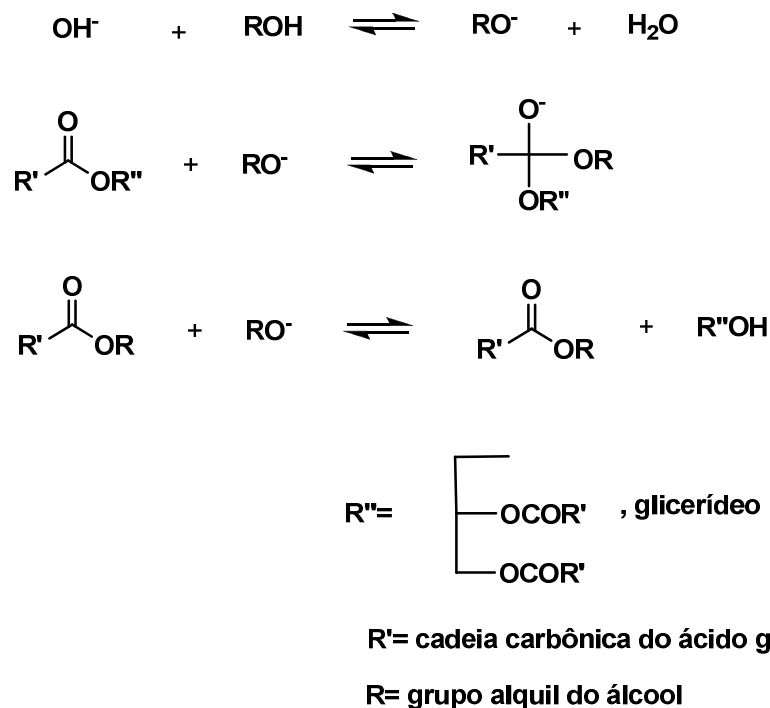
produção de biodiesel com etanol derivado da cana-de-açúcar (biomassa) é um processo independente do petróleo, diferentemente da produção via metanol (FERREIRA *et al.*, 2008). O etanol, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico que o metanol e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade (LOBO e FERREIRA, 2009). Uma desvantagem do etanol está no fato deste promover uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação.

Como a reação de transesterificação é reversível, um excesso de álcool é utilizado em relação ao triglicerídeo a fim de favorecer o equilíbrio para a formação de ésteres de alquila e glicerol. Para o metanol que é mais reativo, a razão molar com relação ao triglicerídeo comumente empregada é de 6:1, enquanto que para o etanol, a razão varia de 9:1 a 12:1 (LOBO e FERREIRA, 2009).

Os catalisadores empregados na reação são ácidos, bases ou heterogêneos. Os catalisadores ácidos utilizados são os ácidos: sulfúrico, hidrocloreídrico ou sulfônico. Os catalisadores básicos incluem hidróxidos de sódio e potássio, carbonatos e alcóxidos. A transesterificação catalisada por bases é mais rápida que a catalisada por ácidos e frequentemente é mais utilizada na indústria (MA e HANNA, 1999). A escolha por catálise ácida ou básica depende do conteúdo de ácidos graxos livres na matéria-prima. Esse conteúdo não deve exceder certo limite para ser possível uma catálise básica (SHARMA *et al.*, 2008). Nas Figuras 1 e 2 são apresentados os mecanismos de transesterificação ácida e básica, respectivamente.



**Figura 1 – Mecanismo de transesterificação ácida**



**Figura 2 – Mecanismo de transesterificação básica**

Os catalisadores básicos e ácidos são homogêneos e, portanto os ésteres e o glicerol têm que ser separados dos catalisadores por lavagens com água destilada. Assim, pesquisadores apresentam catalisadores heterogêneos como uma opção para solucionar esse problema de consumo de água e tempo, pois eles pode ser separados por filtração (SHARMA *et al.*, 2008). Os catalisadores heterogêneos

incluem enzimas, silicatos de titânio, compostos com metais alcalinos terrosos, resinas trocadoras de ânions e guanidinas heterogêneas sobre polímeros orgânicos (VICENTE *et al.*, 2004).

A reação de transesterificação pode ocorrer sem catalisador. Neste caso, são controladas temperatura e pressão críticas do álcool. A transesterificação de triglicerídeos por fluido supercrítico pode ser feita com metanol, etanol, propanol e butanol (DEMIRBAS, 2006). Esse método livre de catalisador foi desenvolvido recentemente empregando fluido supercrítico com metanol para produção de ésteres metílicos do óleo de colza (SAKA e KUSDIANA, 2001).

### 3.1.5 Métodos enzimáticos, glicerólises e esterificação

A utilização da reação de transesterificação com catalisadores básicos para obtenção de biodiesel a partir de matérias-primas com teor de ácidos graxos livres superior a 2% forma sabões que inibem a reação e dificultam a separação do glicerol do éster (NREL, 2004). Neste caso podem ser feitos dois processos: eliminação dos ácidos graxos por adição de hidróxido de sódio e posterior centrifugação ou conversão dos mesmos a biodiesel.

Para o aproveitamento desses ácidos para produção de biodiesel são utilizados: métodos enzimáticos, glicerólise ou esterificação. Métodos enzimáticos requerem enzimas caras e não são usados em escala comercial (NREL, 2004). A glicerólise envolve a adição de glicerol à matéria-prima e aquecimento a alta temperatura (200 °C), na presença de um catalisador, como cloreto de zinco (NREL, 2004). O glicerol reage com os ácidos graxos livres para formar mono-, diglicerídeos e água, sendo a água vaporizada imediatamente. Com isso é reduzido o teor de ácidos graxos livres para posterior transesterificação básica. No entanto, a glicerólise é uma reação lenta e necessita de alta temperatura.

Quando postos para reagir óleos ou gorduras com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador ácido ocorrem duas reações: transesterificação dos triglicerídeos e esterificação dos ácidos graxos livres (NREL, 2004). Entretanto, a transesterificação por catálise ácida é lenta. Por isso, usualmente é realizada primeiro a esterificação com redução do teor de ácidos graxos livres para possibilitar posterior transesterificação básica. A transesterificação básica é mais rápida e com a

utilização de ambos os processos (transesterificação e esterificação) há um aproveitamento maior da matéria-prima para a conversão em biodiesel.

Recentemente, um novo método denominado adição *on pot* de ácido sulfúrico foi desenvolvido para produção de biodiesel (HAERTEL, 2009). O princípio do método baseia-se na transesterificação básica com reação de saponificação paralela seguida pela adição *on pot* de ácido sulfúrico com neutralização do sabão levando à formação de ácidos graxos livres. Após etapas de purificação é realizada a reação de esterificação.

Em matérias-primas com conteúdo muito alto de ácidos graxos livres é realizada somente a reação de esterificação para obtenção de biodiesel (TESSER *et al.*, 2009). Pode ser via catálise homogênea ácida, por catálise heterogênea com, por exemplo, resinas ácidas trocadoras de íons, ou ainda, sem catalisador utilizando fluido supercrítico (SHOTIPRUK *et al.*, 2009).

### **3.2 Biodiesel**

O Professor Expedito Parente, da Universidade Federal do Ceará, descobriu o biodiesel a partir do óleo de algodão e, em 1980, registrou a primeira patente mundial de biodiesel (PETROBRAS, 2007). O biodiesel é definido como um combustível composto de ésteres de alquila de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais (ANP 04/2010). Embora as microalgas não façam parte dessa definição, atualmente tem se produzido biodiesel de microalgas via reações de esterificação e transesterificação, pois óleos vegetais e gorduras animais não são suficientes para suprir a demanda de biodiesel (SPOLAORE *et al.*, 2006).

O biodiesel é bastante semelhante ao óleo diesel em propriedades físicas e químicas, como observado na Tabela 1, portanto é considerado como o melhor substituto ao diesel (FERREIRA *et al.*, 2008). Desse modo, pode ser usado puro ou misturado ao óleo diesel sem qualquer alteração no motor a diesel, na distribuição e infra-estrutura de armazenamento de combustíveis existentes (TAN e VAN GERPEN, 1999).

**Tabela 1 – Comparação das propriedades físicas e químicas do diesel Nº2\* e do biodiesel**

<b>Propriedade</b>	<b>Diesel</b>	<b>Biodiesel</b>
Poder calorífico superior (btu gal <sup>-1</sup> )	~ 137,640	~127,042
Poder calorífico inferior (but gal <sup>-1</sup> )	~129,050	~118, 170
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) a 40 °C	1,3 – 4,1	4,0 - 6,0
Massa específica (kg L <sup>-1</sup> ) a 15,5 °C	0,85	0,88
Densidade (lb gal <sup>-1</sup> ) a 15,5 °C	7,1	7,3
Carbono (% massa)	87	77
Hidrogênio (% massa)	13	12
Oxigênio, por dif. (% massa)	0	11
Enxofre (% massa)	0,0015 máx	0 – 0,0024
Ponto de ebulição (°C)	180 – 340	315 – 350
Ponto de fulgor (°C)	60 – 80	100 – 170
Ponto de nuvem (°C)	-35 a 5	-3 a 15
Ponto de fluidez (°C)	-35 a -15	-5 a 10
Número de cetanos	40 a 55	48 – 65

Fonte: NREL, 2009

\*Propriedades físicas e químicas do Diesel Nº2 (gasóleo que caminhões e carros movidos a diesel utilizam) segundo ASTM D 975 Standard Specification for Diesel Fuel Oils

\*Propriedades físicas e químicas do biodiesel segundo ASTM D 6751 Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels

A designação do biodiesel puro é B100 (100% de ésteres de alquila) (FERREIRA *et al.*, 2008). O biodiesel normalmente é utilizado misturado ao óleo diesel conforme a legislação de cada país. A mistura óleo diesel/biodiesel é nomeada, por exemplo, como B 4 sendo constituída de 4% de B100 (biodiesel) e 96% de diesel.

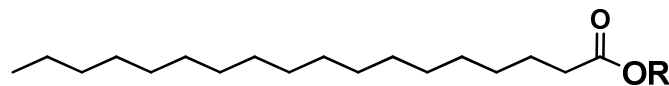
O biodiesel não é derivado do petróleo e, por isso quando comparado ao óleo diesel reduz o acúmulo de dióxido de carbono e reduz as emissões de monóxido de carbono, óxidos de enxofre, hidrocarbonetos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrados, fuligem, material particulado e, sob algumas condições, óxidos de nitrogênio (DEMIRBAS, 2009;

FUKUDA, 2001). Essas reduções aumentam conforme se adiciona mais biodiesel na mistura óleo diesel/biodiesel.

Além dessas vantagens o biodiesel é biodegradável e pode ser produzido internamente com a possibilidade de reduzir importações de petróleo (DEMIRBAS, 2009). A biodegradabilidade do biodiesel tem sido proposta como a solução para o problema dos resíduos. Ele se degrada quatro vezes mais rápido que o petrodiesel em virtude da presença do oxigênio em sua cadeia e não é tóxico. Nas Figuras 3 e 4 são representadas as estruturas químicas características dos constituintes do diesel e do biodiesel.



**Figura 3 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do diesel**



**Figura 4 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do biodiesel**

### **3.3 Produção e uso de biodiesel**

Nos Estados Unidos e nos países que integram a União Européia é produzido e utilizado biodiesel comercialmente (MDIC, 2006). Ambos são os detentores das maiores capacidades de produção no mundo. Outros países como Canadá, Austrália, Filipinas, Argentina, Japão, Índia, Malásia e Taiwan incentivam a produção e o uso do biodiesel, assim como o Brasil.

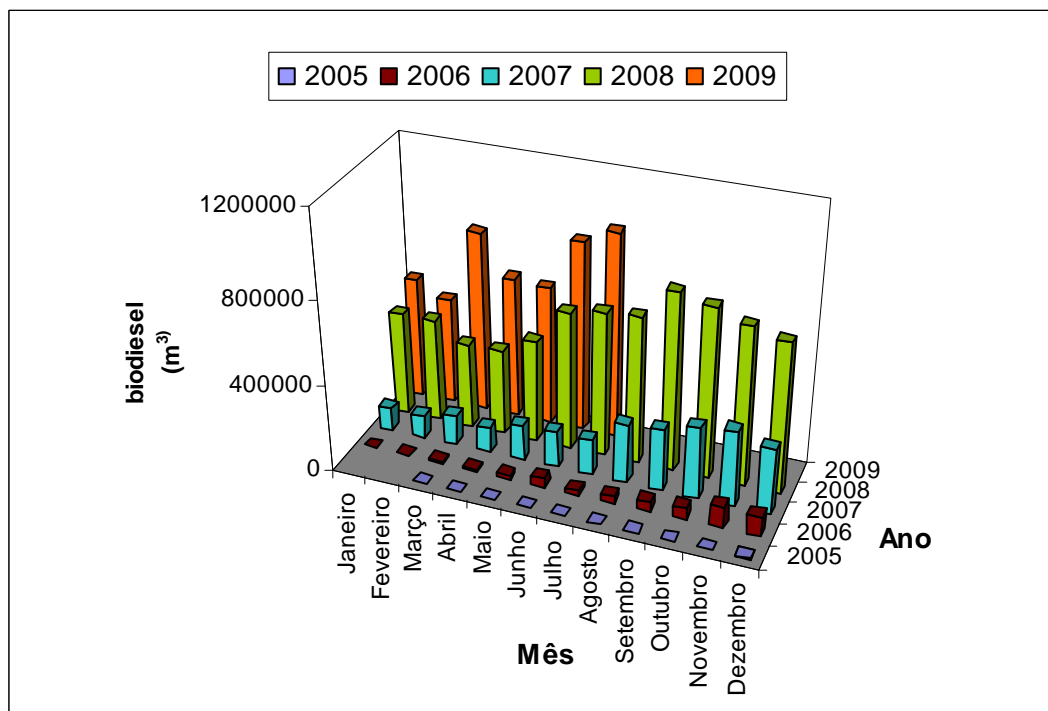
A União Européia produz biodiesel em escala industrial desde 1992. Dados de 2006 apontam 120 plantas industriais e uma produção de 6,92 milhões de metros cúbicos (SEBRAE, 2007). As plantas ficam localizadas na Alemanha, na França, na Itália, na Áustria e na Suécia, sendo a Alemanha o país com maior número de plantas industriais. No ano de 2006, a Alemanha foi responsável por 44% da produção de biodiesel da União Européia, seguida pela Itália com 14% e França com 13%. A principal matéria-prima utilizada é a colza, e em menores proporções a soja, a palma e o girassol (SEBRAE, 2007).



Em 2006, nos EUA 105 plantas industriais estavam em operação produzindo 3,28 milhões de metros cúbicos de biodiesel (MDIC, 2006). A principal matéria-prima é o óleo de soja, e em menores proporções óleos de frituras e outras fontes.

No mundo, os percentuais de adição do biodiesel ao óleo diesel variam de 2% a 30%. Dados de 2003 destacam Alemanha e França com parte de sua frota circulando com biodiesel puro. E, além disso, na Alemanha é ofertado o biodiesel puro para o consumidor definir qual percentagem de biodiesel lhe convém a adicionar no diesel.

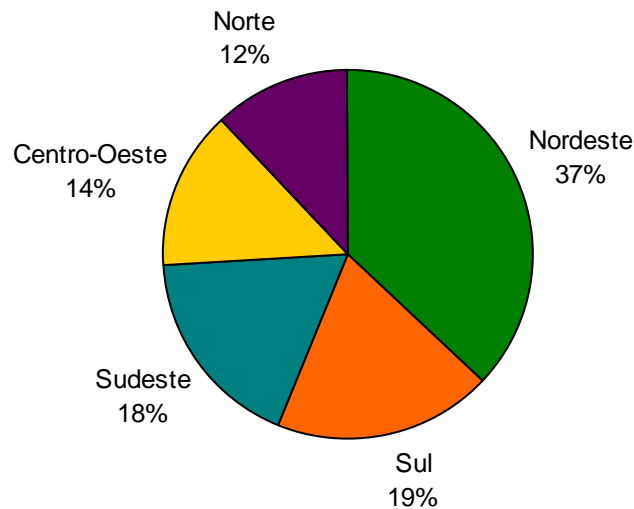
A lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005 introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP que passou a denominar-se Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2009). Desde a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, em janeiro de 2005, até julho de 2009 houve um crescente aumento na produção de biodiesel, como observado na Figura 5.



**Figura 5 – Produção de biodiesel no Brasil de 01/2005 a 09/2009 (Fonte: ANP, 2009)**

Na Figura 6 é observada a participação de cada região do país nessa

produção.



**Figura 6 – Produção de biodiesel por região no ano de 2007 (Fonte: MDIC, 2006)**

Em 2008, ocorreu ampliação da produção brasileira de biodiesel em 190%. Isso reduziu a necessidade nacional de importação do diesel, ocasionando ganho na balança comercial (MME, 2008). Foi evitada a importação de 1,1 bilhões de litros de diesel o que representou um ganho de aproximadamente US\$ 976 milhões na balança comercial. Por outro lado, a importação de diesel ultrapassou 4 bilhões de litros, aumento de 36% em relação a 2007. Em 2008 foram gastos 4,9 US\$ bilhões com essa importação e em 2007 2,5 US\$ bilhões. Caso não houvesse a adição de biodiesel esse gasto seria maior.

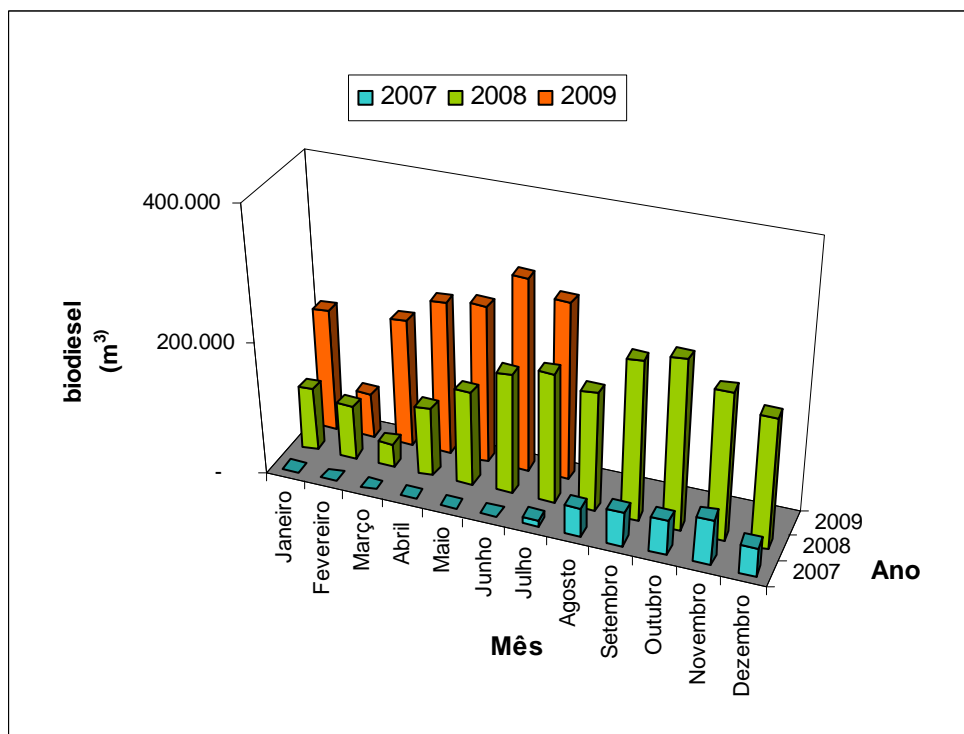
O biodiesel, além de ser um combustível ambiental e socialmente correto, se configura como uma alternativa para eliminar a dependência do diesel importado. Propicia também a movimentação de economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços.

No Brasil o óleo de soja é a matéria-prima mais utilizada para a fabricação de biodiesel, seguido da gordura bovina e do óleo de algodão. Em julho de 2009 a participação do óleo de soja foi de 78,7%, 14,62% para gordura bovina, 4,11% para o óleo de algodão e 2,57% para outras matérias-primas (ANP, 2009). O Brasil é um país que, por sua extensa área geográfica, clima tropical e subtropical, favorece o cultivo de uma ampla diversidade de oleaginosas para a produção de biodiesel (SEBRAE, 2007). São elas: soja, algodão, amendoim, mamona, girassol, tungue,

babaçu, canola, dendê, gergelim, jojoba, linhaça, buriti, nabo forrageiro, palmiste, pequi, pinhão-manso, tucumã. Por isso, o Brasil é um país com potencial invejável na produção de biodiesel. São usadas também matérias-primas como óleos de descarte, resíduo industrial, gorduras animais e óleos já utilizados em frituras de alimentos. Além disso, há incentivo através de pesquisas para produção de biodiesel de microalgas.

Entre janeiro e junho de 2008 passou a ser obrigatória a utilização do B2 no Brasil. A partir de julho de 2008, o uso do B3 e a partir de 1º de julho de 2009 o uso do B4. A exceção é o óleo diesel para uso aquaviário que só deverá conter biodiesel a partir de 01/01/2011 (ANP, 2009). E em fevereiro desse ano passou a ser utilizado o B5 (ANP 04/2010).

O estado do Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor de biodiesel no Brasil e tem apresentado um crescimento notório na sua produção, como visto na Figura 7. Além de oleaginosas comuns como soja e girassol, o estado apresenta potencial para produção de biodiesel a partir de mamona, canola, pinhão-manso e tungue.



**Figura 7 – Produção de biodiesel no Rio Grande do Sul de 01/2007 a 09/2009 (Fonte: ANP, 2009)**

### 3.3.1 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel

#### 3.3.1.1 Girassol

O girassol, *Helianthus annuus L.*, é uma oleaginosa anual da família Compositae, originária do continente Norte Americano. O girassol atualmente é cultivado em todos os continentes, sendo a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo (EMBRAPA, 2009).

É uma oleaginosa com características importantes, como maior resistência à seca, ao frio e ao calor; se adapta a diferentes condições de solo e clima, podendo ser cultivada desde o estado do RS, no Hemisfério Sul, até o estado de Roraima, no hemisfério norte. Sua produção é pouco influenciada pela latitude, altitude e fotoperíodo. É uma cultura que promove a ciclagem de nutrientes ao longo do solo e disponibiliza uma grande quantidade de nutrientes pela mineralização dos restos culturais. Em virtude dessas características pode ser utilizada nos sistemas de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos; pode ser cultivada como primeira cultura, aproveitando o início das chuvas (inverno-primavera), ou como segunda cultura (verão-outono), aproveitando o final das chuvas (EMBRAPA, 2009; CAMPOS LEITE, 2007).

A planta inteira do girassol pode ser utilizada como adubo verde, forragem e silagem. Sua raiz serve como matéria orgânica e para reciclagem de nutrientes do solo; seu caule é usado na construção civil como isolante térmico e acústico (UNGARO, 1985 apud FIGUEIREDO *et al.*, 2008); sua folha pode ser usada como herbicida natural (ALVES, 2008 apud FIGUEIREDO *et al.*, 2008); os capítulos fornecem sementes utilizadas na alimentação animal e também podem ser cultivados como pasto apícola, paisagismo e decoração (MOREIRA, 2007 apud FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Das sementes é extraído óleo, utilizado na alimentação humana, produção de biodiesel e cosméticos; as cascas são usadas na alimentação animal, e ainda podem ser prensadas na forma de aglomerado para a indústria de móveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A obtenção do óleo pode ser via extração com solvente, tendo como subproduto o farelo, ou por processo mecânico tendo como subproduto a torta. A torta e o farelo de girassol são utilizados na produção de rações para animais.

As sementes de girassol contêm de 45 a 55% de óleo (RASHID *et al.*, 2008). O óleo de girassol é comestível e possui em sua constituição pequena percentagem em ácidos saturados e apresenta como principal constituinte um ácido poliinsaturado (linoleico), como observado na Tabela 2 (CASAS *et al.*, 2010). O ácido linoleico é essencial ao desempenho das funções fisiológicas do organismo humano e deve ser ingerido através dos alimentos, já que não é sintetizado pelo organismo (EMBRAPA, 2009). Por essas características é um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional e organoléptica do mundo, agindo na prevenção de diferentes doenças cardiovasculares e no controle do nível de colesterol no sangue. O óleo de girassol também é utilizado para produção de biodiesel, sendo que ambos apresentam o mesmo perfil graxo, Tabela 2.

**Tabela 2 - Composição de ácidos graxos no óleo de girassol**

Ácido graxo	Composição (%)
Ácido Palmítico C16:0	6,2
Ácido Esteárico C18:0	3,7
Ácido Oléico C18:1	25,2
Ácido Linoléico C18:2	63
Ácido Linolênico C18:3	0,1
Outros	< 1,8

Fonte: CASAS *et al.*, 2010

### 3.3.1.2 Mamona

A mamona, *Ricinus communis*, é uma oleaginosa da família Euphorbiaceae. Ela cresce na selva em grande quantidade na maioria dos países tropicais e subtropicais, e é tolerável à variações nas condições do tempo (OGUNNIYI, 2006). O cultivo da mamona é um dos mais tradicionais no semi-árido brasileiro. A planta é encontrada de forma espontânea em várias regiões do Brasil, desde o estado do Amazonas até o estado do RS.

As sementes de mamona são consideradas venenosas para humanos e animais porque contêm ricina, ricinina e certos alérgenos que são tóxicos. A ingestão acidental de sementes de mamona causa dor no abdômen, vômitos e diarreia. A ingestão de uma pequena quantidade de ricina, 1 mg, pode matar um adulto (OGUNNIYI, 2006).

Das sementes da mamona é extraído o óleo, através da combinação ou não de um mecanismo de prensagem e extração com solvente. Quando utilizado o mecanismo de prensagem certa quantidade de óleo permanece junto ao subproduto,

a torta, e a forma de recuperar esse óleo se dá através do processo de extração com solvente.

O subproduto da extração do óleo, a torta, é principalmente usado como fertilizante. Não é adequado como alimento para animais devido à presença da proteína tóxica ricina e alérgenos tóxicos. Há estudos na literatura sobre a desintoxicação da torta para permitir o uso em alimentação animal, incluindo tratamentos com amônia, soda cáustica dentre outros. Embora o uso da torta desintoxicada como alimentação bovina tenha sido relatada é necessária extrema cautela e experimentação (WOODEND, 1993 apud OGUNNIYI, 2006).

Existe uma variedade de sementes de mamona e elas contêm de 46 a 55% de óleo. O óleo produzido não é tóxico, pois os componentes que conferem a toxicidade as sementes não são carregados com o óleo. O óleo de mamona não é comestível e pode ser usado para diversos fins, principalmente como matéria-prima para produtos químicos industriais devido a sua "única estrutura". É constituído em torno de 90% de um triglicerídeo derivado do ácido ricinoléico e 10% de ácidos graxos não-hidroxilados, principalmente os ácidos linoléico e oléico. Na Tabela 3 é apresentada a composição química detalhada desse óleo (CANOIRA *et. al.*, 2010). O óleo de mamona é usado como matéria-prima para tintas, revestimento, lubrificantes e uma variedade de outros produtos. As pontes de hidrogênio dos grupos hidroxila conferem alta viscosidade ao óleo, o que permite o seu uso em misturas lubrificantes. O óleo de mamona também possui várias aplicações medicinais, por exemplo o uso como laxante.

Além disso, há inúmeras reações feitas com esse óleo para modificá-lo e ter novas aplicações. A redução com hidrogênio para produzir o óleo de mamona hidrogenado é uma delas, o qual é usado em cosméticos, tratamentos para cabelos, pomadas, preparação do ácido hidroxiesteárico e seus derivados (OGUNNIYI, 2006). O maior destaque nesse caso é dado às reações de transesterificação e esterificação para produção do biodiesel de mamona, o qual tem o mesmo perfil graxo do óleo (Tabela 3).

**Tabela 3 - Composição de ácidos graxos no óleo de mamona**

Ácido graxo	Composição (%)
Ácido Ricinoléico C18:1(9)-OH (12)	87,10
Ácido Linoléico C18:2	5,27
Ácido Oléico C18:1	3,81
Ácido Esteárico C18:0	1,31
Ácido Palmítico C16:0	1,25
Ácido Linolênico C18:3	0,81
Ácido Eicosanóico C20:1 (11)	0,38
Ácido Linolênico C18:3	0,05
Ácido Behênico C22:0	0,01
Ácido Erúcico C22:1	0,01

Fonte: CANOIRA *et. al.*, 2010

Assim como óleo, o biodiesel de mamona possui alta viscosidade em função da alta concentração em sua composição do éster derivado do ácido ricinoléico. Essa característica acarreta vários problemas quando o biodiesel de mamona é utilizado: queima incompleta do biocombustível provocando formação de acúmulos de carbono nos bicos injetores e nos anéis de pistões (MACEDO BELTRÃO e OLIVEIRA, 2008). A mistura do biodiesel de mamona com biodiesel oriundo de outras fontes com percentual de 40% do primeiro é o indicado para esse caso, pois resulta em uma viscosidade dentro dos padrões estabelecidos pela resolução ANP nº 7 de 19 de março de 2008.

### 3.3.1.3 Soja

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) foi a única cultura a ter um crescimento expressivo na área cultivada nas últimas três décadas no Brasil (EMBRAPA, 2009). O Brasil é um país com uma variedade climática muito grande, não existindo uma época para o cultivo da soja; de um modo geral a soja é plantada quando já passou o período de geadas e o solo está úmido. As sementes de soja geram 40% de proteína e 20% de óleo. Como o teor de óleo é pequeno o processo de extração é somente por solvente (SARTORI *et al.*, 2009). A proteína, farelo obtido na extração, é utilizada como ração animal. O óleo de soja tem vários usos como: para cozinhar (assar e fritar alimentos), e como matéria-prima na produção industrial de tintas, corantes, lubrificantes, plásticos e biodiesel (DYER e MULLEN, 2008; SHIBATA *et al.*, 2008). Na Tabela 4 é apresentado o perfil graxo do óleo e do biodiesel de soja.

**Tabela 4 - Composição de ácidos graxos no óleo de soja**

Ácido graxo	Composição (%)
Ácido Linoléico C18:2	50,5
Ácido Oléico C18:1	25,8
Ácido Palmítico C16:0	11,3
Ácido Linolênico C18:3	6,8
Ácido Esteárico C18:0	4,6

Fonte: ZHANG *et al.*, 2009

#### 3.3.1.4 Sebo bovino

Resíduos de carne das indústrias alimentícias são caracterizados pelo baixo custo, por isso o interesse no uso de gorduras de origem animal (sebo bovino e banha de porco) para a produção de biodiesel tem aumentado (LEBEDEVAS e VAICEKAUSKAS, 2006). O sebo bovino é o tipo de gordura animal mais utilizado para a obtenção de biodiesel, e é definido como o produto obtido a partir de resíduos de tecidos bovinos processados em: digestores de batelada ou contínuos, extração da gordura por prensa, centrífuga ou pelo método de extração de solventes orgânicos (DA CUNHA, 2008).

O biodiesel produzido a partir de gorduras animais é dito economicamente mais viável que o oriundo de óleos vegetais (CANAKCI *et al.*, 2007). A composição química das gorduras animais e óleos vegetais também determina vantagens e desvantagens entre ambas as matérias-primas no biodiesel produzido. Óleos vegetais (Tabelas 2, 3 e 4) e gorduras animais (Tabela 5) (WYATT *et al.*, 2005) apresentam composição química diferente: os óleos são ricos em ésteres derivados de ácidos graxos insaturados e as gorduras em ésteres derivados de ácidos graxos saturados (IMAHARA *et al.*, 2006). Em virtude disso, o biodiesel oriundo de óleos vegetais quando comparado ao obtido de gorduras animais tem as vantagens de ter baixos pontos de névoa, de entupimento de filtro e de fusão; e as desvantagens de baixo número de cetanos e menor estabilidade à oxidação (LEBEDEVAS e VAICEKAUSKAS, 2006). Como consequência, o biodiesel de origem vegetal é indicado para uso em climas frios ao passo que o de origem animal não.

As misturas de ésteres de alquila de gorduras animais e óleos vegetais são caracterizadas pelo melhor comportamento em temperaturas frias (LEBEDEVAS e VAICEKAUSKAS, 2006). Portanto, os produtores têm misturado pequena quantidade de sebo bovino em óleos vegetais para a produção de biodiesel.



**Tabela 5 - Composição de ácidos graxos do sebo bovino**

Ácido graxo	Composição (%)
Ácido Oléico C18:1	47,2
Ácido Palmítico C16:0	23,8
Ácido Estearico C18:0	12,7
Ácido Palmitoléico C16:1	4,7
Ácido Mirístico C14:0	3,1
Ácido Linoléico C18:2	2,6
Ácido Heptadecanóico C17:0	1,1
Ácido Miristoléico C14:1	1,3
Ácido Linolênico C18:3	0,8
Ácido Pentadenóico C15:0	0,5

Fonte: WYATT *et. al.*, 2005

### 3.4 Análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel

O biodiesel pode ser obtido pelas reações de transesterificação e esterificação.

Transesterificação é uma reação química entre uma molécula de triglicerídeo e três moléculas de álcool de cadeia curta com ou sem catalisador formando três moléculas de ésteres de alquila (biodiesel) e uma molécula de glicerol. Sendo ao final o biodiesel separado do glicerol, chamado de glicerol livre, e dos resíduos de álcool. A reação de transesterificação consiste da seqüência de três reações reversíveis consecutivas onde triglicerídeos são convertidos a diglicerídeos, e estes são convertidos a monoglicerídeos seguido pela conversão de monoglicerídeos a glicerol. Por isso a presença de glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel é possível.

Contaminantes como glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos após o processo de transesterificação são os principais fatores determinantes na qualidade do biodiesel (MITTELBACH, 1996; KNOTHE, 2000). Elevadas concentrações de glicerol livre podem causar problemas de armazenamento, pois se observa nos tanques de estocagem de misturas diesel:biodiesel a separação do glicerol (MITTELBACH *et al.*, 1983; RUPPEL e HALL, 2004). Nesse caso, essas misturas diesel:biodiesel quando usadas também podem gerar problemas tais como emissões de aldeídos, formação de depósitos e entupimento dos bicos injetores do motor. Mono-, di- e triglicerídeos quando não reagem na transesterificação podem aumentar a viscosidade do biodiesel e em virtude disso reduzir da combustão, provocando entupimento do filtro

de combustível e depósitos em pistões, válvulas e bicos injetores do motor (MITTELBACH *et al.*, 1983; RUPPEL e HALL, 2004).

A determinação de glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos além de indicar a qualidade do produto final, indica a eficiência do processo de produção, pois glicerol livre serve como parâmetro para avaliar a etapa de purificação do biodiesel e a quantidade de mono-, di- e triglicerídeos são utilizadas para verificar a conversão de óleos e gorduras em biodiesel.

O somatório do conteúdo de glicerol livre e dos mono-, di- e triglicerídeos potencialmente ligáveis é denominado glicerol total.

A presença de mono-, di- e triglicerídeos residuais, assim como a composição química do biodiesel, está relacionada com o perfil graxo da gordura e/ou do óleo utilizado como matéria-prima. São considerados na determinação desses resíduos os constituintes com maior porcentagem no perfil graxo. Portanto, no caso do biodiesel de girassol e da mistura de sebo:soja (20:80) devem ser considerados mono-, di- e triglicerídeos referentes a C 16:0, C 18:0, C 18:1, C18:2; e no caso do biodiesel de mamona os referentes a C 16:0, C 18:0, C 18:1, C 18:1-OH e C18:2.

#### 3.4.1 Estruturas e informações químicas (ANEXO A)

No ANEXO A são apresentadas as estruturas e as informações químicas dos compostos considerados na determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de girassol, mamona e da mistura de sebo e soja.

#### 3.4.2 Métodos de referência e os limites máximos de resíduos

No Brasil, as especificações contidas na Resolução nº 4 de 2 de fevereiro de 2010 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP 04/2010), foram constituídas com base nas normas: American Society for Testing and Materials ASTM D 6751 dos Estados Unidos da América e Norme Européenne 14214 da União Européia, ambas para B100.

Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados, respectivamente, os métodos de referência e os limites máximos de resíduos permitidos para glicerol livre e total,

mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel estabelecidos pela ANP 04/2010, ASTM D 6751 e EN 14214.

**Tabela 6 – Métodos de referência para análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel de acordo com os padrões ANP 04/2010, ASTM D 6751 e EN 14214**

Parâmetro	ANP 04/2010	ASTM D 6751	EN14214
	Método	Método	Método
Glicerol livre	ABNT NBR 15341	ASTM D 6584	EN 14105
	EN 14105		EN 14106
	EN 14106		
	ASTM D 6584		
Monoglicerídeos	ABNT NBR 15342	ASTM D 6584	EN14105
	EN 14105		
	ASTM D 6584		
Diglicerídeos	ABNT NBR 15342	ASTM D 6584	EN 14105
	EN 14105		
	ASTM D 6584		
Triglicerídeos	ABNT NBR 15344	ASTM D 6584	EN 14105
	EN 14105		
	ASTM D 6584		
Glicerol total	ABNT NBR 15344	ASTM D 6584	EN14105
	ASTM D6584		
	EN 14105		

Com exceção do método ABNT NBR 15344 que emprega iodometria, os outros métodos citados na Tabela 6 empregam GC-FID.

Os métodos, ASTM D 6584 e EN 14105, estabelecidos pelas normas ASTM D 6751 e EN 14214 são adequados para análise simultânea de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em ésteres metílicos oriundos de óleo de colza, girassol, soja ou ésteres metílicos de composição química semelhante a esses. No entanto, não pode ser aplicado a ésteres metílicos obtidos de fontes que possuam em sua constituição graxa ácido láurico (C12:0), devido à sobreposição de picos. Exemplos desse tipo são os ésteres metílicos dos óleos de coco e palmiste. A Resolução ANP 04/2010 estabelece os mesmos métodos para análise desses parâmetros, mas

quando o biodiesel é oriundo de óleo de mamona ou misturas de biodiesel em que uma das matérias-primas é o óleo de mamona são indicados os métodos ABNT NBR 15341, ABNT NBR 15342 e ABNT NBR 15344.

Para análise somente de glicerol livre podem ser usados os métodos ABNT NBR 15341 (indicado para biodiesel de qualquer oleaginosa) e EN 14106 que foi aplicado a biodiesel de girassol, colza e misturas de ambos.

**Tabela 7 - Limites máximos de resíduos permitidos para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicérides no biodiesel de acordo com os padrões ANP 04/2010, ASTM D 6751 e EN 14214**

Parâmetro	ANP 04/2010	ASTM D 6751	EN 14214
	Limite	Limite	Limite
Glicerol livre	0,02% (m/m) máx	0,02% (m/m) máx	0,02% (m/m) máx
Monoglicérides	Anotar	---	0,8% (m/m) máx
Diglicérides	Anotar	---	0,2% (m/m) máx
Triglicérides	Anotar	---	0,2% (m/m) máx
Glicerol total	0,25% (m/m) máx	0,24% (m/m) máx	0,25% (m/m) máx

Com relação aos limites máximos de resíduos no biodiesel (Tabela 7), para glicerol livre todas as normas estabelecem a mesma concentração, para glicerol total EN 14214 e ANP 04/2010 estabelecem o mesmo limite e a ASTM D 6751 uma concentração semelhante. A EN 14214 indica também limite máximos de resíduos para mono-, di- e triglicérides.

### 3.4.3 Reação de silição

Derivatização é um processo químico para modificar os compostos, a fim de gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas (SCHUMMER *et al.*, 2009). As maiores limitações para análise por cromatografia em fase gasosa, tais como elevada polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica dos compostos podem ser contornadas pela derivatização. Assim, muitos compostos que não são analisados por cromatografia em fase gasosa podem ser analisados na forma de um derivado (LANÇAS, 1993).

Para análise por cromatografia gasosa, compostos contendo grupos funcionais como carboxila, hidroxila, amino e tiol, por exemplo, açúcares, esteróides e colesterol, requerem derivatização (SCHUMMER *et al.*, 2009). Isto é devido a capacidade destes compostos de formarem pontes de hidrogênio levando à fraca volatilidade, insuficiente estabilidade térmica e interações dos compostos com a coluna, resultando em baixa detectabilidade (HALKET e ZAIKIN, 2009).

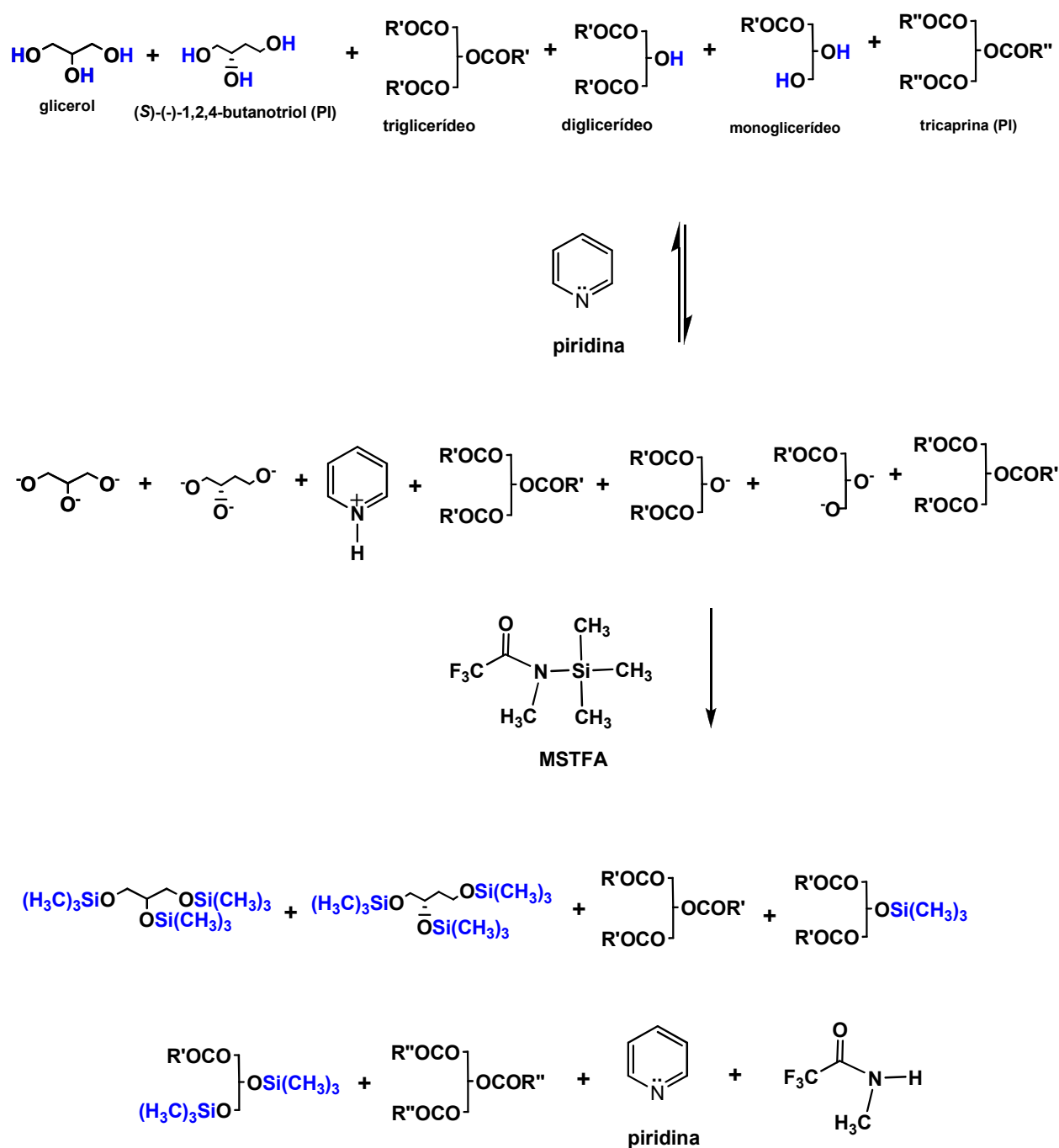
No caso dos compostos analisados neste trabalho a etapa de derivatização também se faz necessária, pois o glicerol interage por pontes de hidrogênio com os grupos silanóis da fase estacionária da coluna levando a sua não eluição e, portanto, não detecção. O mesmo pode ser considerado para o padrão interno, (S)-(-)-1, 2, 4-butanotriol, utilizado para a determinação do glicerol. Por outro lado, os mono- e diglicerídeos também têm sensibilidade reduzida devido à interação por pontes de hidrogênio com a fase estacionária da coluna. Já os triglicerídeos e o padrão interno (tricaprina) dos glicerídeos, pela ausência nas suas estruturas de grupos –OH, com exceção da ricinoleína, não têm a detecção influenciada pela formação de pontes de hidrogênio.

A derivatização é usualmente feita pela substituição de grupos polares, sendo as reações mais comuns a sililação, a alquilação e a acilação. Sililação é a técnica de derivatização mais utilizada, e os reagentes mais comuns são trimetilclorosilano (TMCS), *N*-trimetilsililimidazol (TMSI), *N*-Metil-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), *N,O*-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e *N*-(*t*-Butildimetilsilil)-*N*-trifluoroacetamida (MTBSTFA) (HALKET e ZAIKIN, 2009).

Na reação de sililação, hidrogênios ácidos de álcoois, tióis, amins, amidas, cetonas e aldeídos enolizáveis são substituídos pelo grupo alquil silil. Na análise de glicerol e glicerídeos, estudos sobre a derivatização desses compostos através da reação de sililação foram realizados, sendo que o melhor método foi com uso de MSTFA como reagente derivatizante e piridina como catalisador e tempo de reação de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, conforme é visto na Figura 9 (PLANK e LORBEER citado por PLANK e LORBEER, 1995).

A reação de sililação ocorre através do ataque nucleofílico ( $S_N2$ ) ao agente sililante, e a presença de um bom grupo de saída geralmente melhora o rendimento da reação. Normalmente os produtos da reação são mais voláteis e termicamente estáveis, além do que não requerem etapa de purificação podendo ser injetados diretamente no GC (SCHUMMER *et al.*, 2009). Na Figura 8, a piridina, uma base

relativamente fraca, reage com os hidrogênios lábeis (reação ácido-base), ou seja, atua como catalisador facilitando o ataque nucleofílico ( $S_N2$ ).



R'' = cadeia carbônica do ácido graxo cáprico

Figura 8 – Representação da reação de silação para análise de glicerol e glicerídeos

### 3.4.4 Outros métodos para análise de glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos no biodiesel

Desde 1984 vários métodos cromatográficos têm sido desenvolvidos para a análise de biodiesel. O primeiro método cromatográfico para análise de biodiesel envolveu estudos cinéticos e determinação de metil ésteres, mono-, di- triglicerídeos empregando TLC (Cromatografia de camada fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*) com detecção por FID (FREEDMAN *et al.*, 1984 apud MONTEIRO *et al.*, 2008, LÔBO *et al.*, 2009). Para estudo da reação de transesterificação do óleo de soja antes da análise por GC-FID as amostras foram derivatizadas com BSTFA para análise de mono-, di- e triglicerídeos (FREEDMAN *et al.*, 1986 apud MONTEIRO *et al.*, 2008, LÔBO *et al.*, 2009). HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com DD (Detecção por Densidade do inglês *Density Detection*) foi utilizada para o monitoramento da reação de transesterificação com determinação de mono-, di- triglicerídeos e ésteres metílicos (TRATHNIGG e MITTELBAACH, 1990 apud MONTEIRO *et al.*, 2008, LÔBO *et al.*, 2009). As análises foram realizadas pelo acoplamento de coluna de sílica (modificada com grupo ciano) com duas colunas de GPC (Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*), usando eluição isocrática (clorofórmio/etanol 0,6%). MARIANI *et al.* (1991) utilizaram GC – FID com coluna capilar SE 52 (6 m, x 0,1 µm espessura do filme), reação de silição com dimetildiclorosilano (DMDCS) e piridina e padronização interna com C17metil éster, C17 monoglicerídeo, C38 diglicerídeo para a quantificação de metil ésteres, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel.

BONDIOLI *et al.* (1992) desenvolveram um método por GC-FID para determinação de glicerol livre por GC-FID em ésteres metílicos de canola, girassol, soja, palma e amendoim, após a extração com solvente hidroalcoólico contendo o padrão interno 1,4 butanodiol. Não houve a necessidade de derivatização foi utilizada coluna empacotada de vidro (2 m x 4 mm d.i.) preenchida com Chromosorb 101. Glicerol livre foi analisado por GC com detecção por FID ou MS em metil ésteres após a derivatização com BSTFA, usando uma coluna DB-5 (60 m x 0,25 mm) (MITTELBAACH, 1993 apud MONTEIRO *et al.*, 2008). Esse método é semelhante a outro que envolve derivatização com BSTFA e análise por GC-MS no

modo SIM (Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*) para determinação de mono-, di- e triglicerídeos (PLANK e LORBEER, 1992 apud MONTEIRO *et al.*, 2008 e PLANK e LORBEER, 1995). Um método para determinação simultânea de metanol e glicerol livre foi desenvolvido. O preparo da amostra inclui dissolução em dimetilformamida e silição com BSTFA. A separação foi em coluna capilar de metil silicone e detecção por FID ou MS. Etanol e 1,4 butanodiol foram usados como padrões internos (MITTELBAACH *et al.*, 1996 apud MONTEIRO *et al.*, 2008)

Em 1995, foi desenvolvido método que serviu como base para os métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105. Nesse método foi empregado GC-FID e derivatização com MSTFA para determinação de glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos e conseqüentemente de glicerol total em biodiesel metílico de colza (PLANK e LORBEER, 1995). Esse método pode ser aplicado sem modificações a ésteres metílicos com composição química semelhante ao de colza, como é o caso do biodiesel de girassol, soja e o obtido por óleos usados em frituras. No entanto, não pode ser aplicado a ésteres metílicos obtidos de óleos que possuam em sua constituição graxa o ácido láurico (C12:0).

O monitoramento da reação de transesterificação entre óleo de colza e metanol foi feito por HPLC acoplada a diferentes modos de detecção: APCI-MS (Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry* com Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), ELSD (Detecção por dispersão de luz por evaporação, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*) e UV (Detecção no Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Detector*) em 205 nm (HOLCAPEK *et al.*, 1999). Os autores empregaram fase reversa com eluição por gradiente, sendo desenvolvidos dois métodos diferentes. O primeiro método usou fase móvel não aquosa, 100% de metanol a 50% de metanol e 50% 2-propanol-hexano (5:4, v/v) em 15 min, e foi utilizado para um rápido monitoramento da conversão a biodiesel e quantificação residual de triglicerídeos. O segundo método empregou uma combinação de fase móvel aquosa-orgânica e não aquosa: 70% de acetonitrila e 30% de água em 0 min, 100% acetonitrila em 10 min, 50% acetonitrila e 50% 2-propanol/hexano (5:4, v/v) em 20 min e 5 min de acondicionamento. Assim, foi melhorada a separação de todos os ácidos graxos livres, metil ésteres, mono-, di- e triglicerídeos diferenciando pelo número equivalente de carbono; e através de APCI-MS todos compostos foram identificados.



A detecção por UV apresentou a desvantagem da fraca absorbância de glicerídeos em comprimento de onda maior que 220 nm, além da não quantificação dos glicerídeos saturados. Por outro lado, ELSD e APCI-MS apresentaram decréscimo na sensibilidade com o aumento de ligações duplas nos triglicerídeos. Mas por elucidar informações adicionais sobre as estruturas dos compostos APCI-MS foi considerado o melhor modo de detecção.

A aplicação da ASTM D 6584 foi realizada em biodiesel metílico de soja utilizando injetor *on-column*, pré-coluna com dimensões 254 mm x 0,53 mm d.i. e coluna capilar 5-HT marca Elite de 15 m x 0,32mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme (RUPPEL e HALL, 2004). O uso de GC-FID, HPLC-ELSD e HPLC com PDA (Detecção por Arranjo de Fotodiodos, do inglês *Photodiode Array Detector*) foram comparados na determinação de glicerídeos em biodiesel metílico de soja e colza (FLOGIA *et al.*, 2004). Em algumas amostras de soja houve superestimação na concentração de diglicerídeos quando analisadas por HPLC porque produtos de degradação do biodiesel eluíram na mesma região.

Um método baseado em FTIR (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e GC-MS foi usado para determinação de mono- e diglicerídeos após reação com anidrido trifluoracético (TFAA) (CHONG *et al.*, 2007).

Biodiesel metílico de mamona foi produzido e alguns dos parâmetros de qualidade exigidos foram determinados dentre eles, glicerol livre e total mono-, di- e triglicerídeos (CANORIA *et al.*, 2010). É relatado apenas que o conteúdo de mono-, di- e triglicerídeos foi baixo indicando boa conversão a biodiesel, e que o conteúdo de glicerol livre e total se encontra fora das especificações estabelecidas pela EN 14214 ou ASTM D6751.

O primeiro método por HPLC com PAD (Detecção Amperométrica Pulsada, do inglês *Pulsed Amperometric Detection*) para determinação de glicerol livre em biodiesel metílico e etílico foi descrito por LOZANO *et al.* (1996) apud MONTEIRO *et al.*, 2008).

A quantificação de glicerol livre por duas metodologias distintas foi avaliada: uma empregando método clássico e outra por HPLC. A primeira mostrou boa precisão e exatidão e a segunda foi mais rápida e com mais informações sobre a amostra (SALA e BONDIOLI, 1998).

Um método baseado na extração de glicerol livre do biodiesel com água e subsequente análise por HPLC com RID (Detecção por Índice de Refração do inglês Refractive Index Detection), utilizando coluna TM SGX Separon com 7 µm de tamanho de partícula foi desenvolvido por HAJEK *et al.* (2006). A comparação do método desenvolvido com outro por GC-FID levou aos mesmos resultados.

Métodos foram desenvolvidos para determinação de ésteres, mono-, di-triglicerídeos, metanol e glicerol no biodiesel de girassol utilizando cromatografia líquida com fase reversa, eluição isocrática e gradiente (SANTORI *et al.*, 2009).

Por HPLC-DAD e GC-FID mono-, di- triglicerídeos foram determinados em ésteres metílicos (LECHNER *et al.*, 1997 apud MONTEIRO *et al.*, 2008). O método empregando a combinação de HPLC e GC foi desenvolvido para a determinação de mono-, di- e triglicerídeos em amostras de biodiesel metílico, com tempo de análise de 52 minutos. Antes das determinações, as amostras foram submetidas a acetilação e depois analisadas por HPLC-DAD e GC-FID.

Métodos não cromatográficos também têm sido desenvolvidos para a determinação de glicerol livre e glicerídeos em biodiesel. Para determinação de glicerol livre foram desenvolvidos métodos os quais têm como princípio a oxidação do glicerol com ácido periódico: fotométrico baseado em reações enzimáticas (BAILER e DE HUEBER, 1991 apud MONTEIRO *et al.*, 2008); espectrofotométrico (BONDIOLI e DELLA BELLA, 2005), por eletroforese capilar (GONÇALVES FILHO e MICKE, 2007) e por titulação (SALA e BONDIOLI, 1998). Estão descritos na literatura trabalhos para o monitoramento da reação de transesterificação com determinação de triglicerídeos utilizando ressonância magnética nuclear (GELBARD *et al.*, 1995 e KNOTHE, 2000 apud MONTEIRO *et al.*, 2008), espectroscopia de infravermelho (KNOTHE, 1999, SIATIS, 2006 e ARZAMENDI, 2006 apud MONTEIRO *et al.*, 2008), a quantificação de monoglicerídeos por GPC com RID e a soma de mono-, di- triglicerídeos por espectroscopia de infravermelho (DUBÉ *et al.*, 2004 apud MONTEIRO *et al.*, 2008). Para determinação da presença ou não de mono-, di- triglicerídeos e glicerol no biodiesel foi desenvolvido um método por MS (Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*) com ESI (Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*) (CATHARINO *et al.*, 2007). Esse método também permitiu o monitoramento da degradação, adulteração e identificação do álcool usado na transesterificação.

### 3.5 Cromatografia Gasosa

Os termos e expressões “cromatografia”, “cromatograma” e método cromatográfico são atribuídos ao botânico russo Mikhael SemenovitchTswett, que, em 1906, os utilizou em dois trabalhos. O nome deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrever) embora ele tenha explicitado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (COLLINS *et al.*, 2006).

Cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

Em cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte e a separação ocorre devido às interações das moléculas da amostra com a fase estacionária contida em uma coluna (COLLINS *et al.*, 2006). Os processos físicos envolvidos na separação são de sorção: adsorção ou absorção (partição). A fase estacionária sendo um sólido ocorre a adsorção dos compostos e no caso de ser um líquido ocorre a partição. Em GC o retorno dos compostos a fase móvel está relacionado com a volatilidade dos mesmos.

A grande maioria das análises por GC é realizada em colunas capilares estreitas e compridas, as quais oferecem maior resolução, menores tempos de análise e maior sensibilidade do que as colunas empacotadas, mas têm menos capacidade de amostra (HARRIS, 2008). A fase móvel, gás de arraste, é normalmente hélio, nitrogênio, hidrogênio ou argônio; a escolha da mesma depende da disponibilidade, pureza e consumo do gás além do tipo de detector utilizado (MENDHAM *et al.*, 2002).

Os compostos separados por GC devem ser gases ou substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando os compostos não apresentam essas características, caso em que tem elevada massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, há necessidade de derivatização (COLLINS *et al.*, 2006).

Na determinação de glicerol livre e glicerídeos é indicado injetor *on-column*, ou seja, modo de injeção direta na coluna. Este tipo de injetor é usado para amostras que se decompõem acima de seus pontos de ebulição (HARRIS, 2008).

### 3.5.1 Detecção por Ionização em Chama

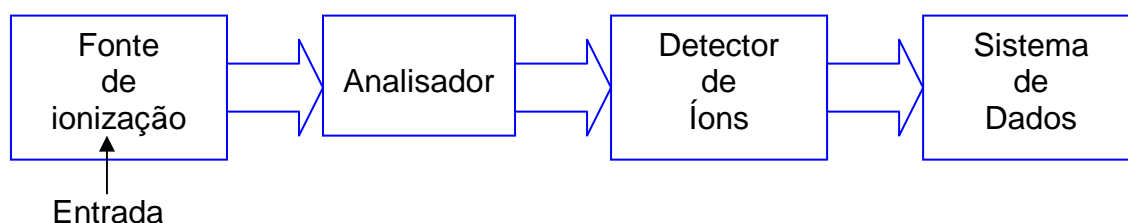
Os métodos de referência estabelecidos pelos padrões ANP 04/2010, ASTM D 6751 e EN 14214 indicam GC-FID para análise de glicerol livre e glicerídeos no biodiesel.

O FID utilizado na determinação de glicerol livre e glicerídeos no biodiesel tem grande aplicabilidade em GC sendo praticamente universal para compostos orgânicos (MENDHAM *et al.*, 2002). Nesse tipo de detecção o efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama ar/hidrogênio e a maioria dos compostos orgânicos quando submetidos a essa chama produz íons e elétrons. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. Poucas centenas de volts são aplicadas entre a ponta do queimador e um eletrodo, localizado acima da chama, que serve para coletar os íons e elétrons (SKOOG, 2006).

### 3.5.2 Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas é um dos detectores mais poderosos para GC (SKOOG, 2006). A espectrometria de massas é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para obter um espectro de massas, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre suas massas e suas cargas elétricas por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre suas massas e suas cargas elétricas,  $m/z$ . Se todas as cargas forem +1, então  $m/z$  será numericamente igual à massa. Se, por exemplo, um íon tiver carga +2,  $m/z$  será  $\frac{1}{2}$  da sua massa (HARRIS, 2008).

Um diagrama de blocos de um espectrômetro de massas moleculares é mostrado na Figura 9.



**Figura 9 – Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas moleculares**

As moléculas da amostra entram no espectrômetro de massas pelo sistema de entrada. No caso da GC, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de GC e a baixa pressão ( $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  Pa) do sistema do espectrômetro de massas (SKOOG, 2006). Um sistema de vácuo é necessário de modo a evitar que os íons sejam defletidos por colisões com moléculas do gás residual (HARRIS, 2008).

As moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que as ioniza. As fontes de ionização são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, e elas produzem fragmentos os quais podem também ser ionizados. Os tipos de ionização disponíveis para a GC são: EI (Impacto de elétrons, do inglês *Electron Impact Ionization*) e CI (Ionização Química do inglês *Chemical Ionization*) (SKOOG, 2006).

Na EI os elétrons emitidos por um filamento aquecido (semelhante ao de uma lâmpada incandescente) são acelerados por meio de um potencial de 70 eV, antes de interagirem com as moléculas que entram na fonte de íons. Algumas moléculas (M) do analito (0,01%) absorvem energia na faixa de 12-15 elétron-volt ( $1\text{eV}=96,5\text{kJ/mol}$ ), é que suficiente para a ionização. Praticamente todas as moléculas estáveis possuem um número par de elétrons. Quando um elétron é perdido, o cátion resultante, com um elétron desemparelhado, é representado com  $M^+$ , um íon molecular. Após a ionização, o íon  $M^+$  normalmente possui energia residual interna suficiente  $\sim 1\text{eV}$  para que ele se fragmente (HARRIS, 2008).

Um pequeno potencial aplicado na placa repulsora da fonte de íons empurra os íons na direção do tubo analisador, próxima seção do espectrômetro de massas. O analisador serve para selecionar os íons de acordo com seus valores  $m/z$ . Um dos analisadores mais comuns são os filtros de massa tipo quadrupolo, nesses o

princípio da análise é a movimentação do íon em campos cc e de radiofreqüência, onde somente certos valores de  $m/z$ .

O espectrômetro de massas pode ser programado em diferentes modos de operação para a aquisição de dados. No modo *scan* o espectrômetro de massas analisa todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de  $m/z$  (VÉKEY, 2001). No modo SIM (Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*) pode selecionar um valor único de  $m/z$  e monitorá-lo durante o experimento cromatográfico, (SKOOG, 2006).

### 3.6 Validação de métodos cromatográficos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI *et al.*, 2004). Com isso, todo novo método analítico deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). A validação envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004).

Órgãos como ICH (International Conference on Harmonization), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISO (International Standard Organization), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e outros exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. No que se refere às técnicas de separação, cromatografia gasosa, líquida e eletroforese capilar, não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, a ANVISA e o INMETRO são as duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios. Os guias disponibilizados para validação de métodos analíticos são a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003. Nesses guias, parâmetros como limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica,

linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez e outros são indicados para a validação de métodos.

### 3.6.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1995 apud RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, denominados curvas analíticas, seguidos de um tratamento estatístico (LANÇAS, 2004). As curvas analíticas são representadas pela Equação (1) da função, usualmente uma reta, sendo:

$$y = ax + b \quad (1)$$

em que:

$y$  = variável dependente – sinal detectado

$x$  = variável independente – concentração da substância em análise

$a$  = coeficiente angular

$b$  = coeficiente linear

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (CUSTODIO *et al.*, 1997 apud RIBANI *et al.*, 2004). Além dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, a correlação que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. A correlação é normalmente calculada por intermédio do coeficiente de Pearson,  $r$  ou pelo coeficiente de determinação,  $r^2$  (MESLEY *et al.*, 1991; MCTAGGART e FARWELL, 1992 apud LANÇAS, 2004). Quanto mais próximo de 1,0 for o valor do coeficiente de Pearson ou de determinação, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um valor de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003; JENKE, 1998; GREEN 1996 apud RIBANI *et al.*, 2004). A Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 um valor acima de 0,90.

É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

#### 3.6.1.1 Padronização interna

Uma variação da curva de calibração consiste em adicionar um padrão interno a cada solução do padrão analítico de forma a corrigir desvios durante o procedimento analítico devido a pequenas mudanças em variáveis experimentais como temperatura da coluna e volume de injeção entre uma concentração e outra no caso de método por cromatografia gasosa.

O padrão interno deve: (a) sempre estar ausente da amostra, (b) deve ser similar à substância a ser quantificada, (c) não reagir com a substância ou outro componente da matriz, (d) ter tempo de retenção próximo a esta substância, (e) estar disponível em elevado grau de pureza, (f) ser adicionado à amostra em concentrações similares ao composto a ser analisado, (g) ser bem resolvido dos outros picos e (h) quando cromatografado, ficar separado de todas as demais substâncias presentes na amostra (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas, às quais se adiciona uma concentração constante do padrão interno. Após análise dessas soluções, é construído um gráfico, relacionando a razão de áreas (área do padrão/área do padrão interno) com a razão das concentrações (concentração do padrão/concentração do padrão interno) (LANÇAS, 2004). A amostra também é analisada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno.

#### 3.6.2 Precisão

A precisão do método analítico é a avaliação da dispersão dos resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra ou amostras semelhantes. Uma forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (Equação (2)), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

$$\text{RSD\% ou CV\%} = \frac{s}{\bar{X}_m} \times 100 \quad (2)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto



$X_m$  = média de uma série de medidas (replicatas)

Métodos que quantificam compostos em quantidades macro requerem valores de RSD de 1 a 2% e métodos para análise de traços são aceitáveis valores de RSD de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão é considerada em três níveis: repetitividade ou repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Os parâmetros de validação são adequados conforme será o uso do método a ser validado. Se o método a ser desenvolvido terá aplicação em somente um laboratório não se faz necessária a avaliação da precisão em termos de reprodutibilidade, o que inclui estudos interlaboratoriais.

Repetitividade e repetibilidade são diferentes designações para uma mesma situação sendo a primeira adotada pelo INMETRO e a segunda pela ANVISA. Há ainda outras denominações como precisão intraensaio ou intra-corrída. A repetitividade trata da concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. A ANVISA indica a avaliação da repetitividade com nove determinações no mínimo, de forma a contemplar o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (limite de quantificação), média e alta, com três réplicas cada no mínimo.

A precisão intermediária do método está relacionada às variações dentro de um mesmo laboratório como diferentes dias e/ou analistas, e/ou equipamentos (LANÇAS, 2004). Através da precisão intermediária é possível verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Os ensaios necessários para a avaliação da precisão intermediária seguem a mesma recomendação da repetitividade.

Além da precisão do método é comum a avaliação da precisão instrumental, sendo calculado RSD (%) para o sinal medido de injeções repetitivas de um mesmo ensaio, ou seja, mesma amostra ou mesmo nível de concentração da curva analítica.

### 3.6.3 Exatidão

A exatidão representa a concordância entre o valor encontrado em um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro, e pode ser expressa como apresentado na Equação (3) (LANÇAS 2004; INMETRO 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

A exatidão está sempre associada à precisão, sendo ambas avaliadas de forma concomitante. Ou seja, são verificadas com nove determinações no mínimo, de forma a contemplar o intervalo linear do método, ou melhor, três concentrações, baixa (limite de quantificação), média e alta, com três réplicas cada no mínimo.

Ensaio de recuperação e o método de adição padrão são utilizados para verificar a exatidão de um método analítico. O primeiro requer um branco da matriz e o segundo é empregado quando se tem uma matriz muito complexa, há interações significativas do composto a ser analisado com a matriz, quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta do composto em interesse.

Os ensaios de recuperação consistem na fortificação da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (BRITO *et al.*, 2003 apud CALDAS 2009).

O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse em diferentes níveis na amostra, antes do seu preparo (RIBANI *et al.*, 2004). Inicialmente é determinada a área do pico da substância na amostra e em seguida são determinadas as áreas resultantes dos diferentes níveis de adição. Após é construída uma curva analítica, sendo traçada uma reta correspondendo a melhor linha entre os pontos. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância na amostra e a extrapolação da reta no eixo das abcissas define a concentração da substância na amostra. O cálculo da exatidão por adição padrão deve considerar a priori a concentração da substância na amostra e relacionar sua respectiva área com as áreas resultantes da

adição em diferentes níveis da substância na amostra. Assim é possível encontrar os valores experimentais em termos de concentração dos diferentes níveis adicionados, e desta forma relacionar com a concentração teórica esperada.

São estabelecidas faixas de valores aceitáveis de exatidão com determinados valores de precisão associados. Por exemplo, na análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (SANCO, 2007). Naturalmente essas faixas estão correlacionadas com a complexidade da amostra e do método empregado, podendo ser ampliadas ou restringidas.

#### 3.6.4 Sensibilidade

A sensibilidade de um método indica sua capacidade de discriminar com uma precisão estabelecida, concentrações próximas de um analito, (LANÇAS, 2004).

A sensibilidade pode ser determinada pela inclinação da curva analítica, considerando que quanto maior a inclinação mais sensível é o método. Ou ainda, ao comparar equações de retas de diferentes métodos aquela que apresentar o maior coeficiente angular representa o método mais sensível.

#### 3.6.5 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método é dito robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2003).

Alguns exemplos e variações são: estabilidade das soluções analíticas, tempo de extração; e em cromatografia líquida influência da variação de pH da fase móvel e da variação da composição da fase móvel dentre outras; em cromatografia gasosa temperatura, velocidade de fluxo e outras (ANVISA, 2003).

A robustez do método também pode ser avaliada através da variação da matriz. PIRARD *et al.* (2007) desenvolveram um método multiresíduo para determinação de agrotóxicos em mel por OCLLE (Extração Líquido-Líquido em Coluna, do inglês *On-column Liquid-liquid Extraction*) usando terra diatomácea como suporte sólido inerte e LC-MS/MS – (Cromatografia Líquida acoplada à

Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*). A robustez desse método foi avaliada frente a mais de cem tipos de mel coletados em diferentes áreas na Bélgica, e frente a outras matrizes, abelhas e ceras. Para a aplicação do método a abelhas e ceras foi necessária modificação no procedimento de preparo da amostra. Os resultados mostraram a robustez do método frente a diferentes tipos de matrizes.

### 3.7 Efeito matriz

A interferência dos componentes da matriz na quantificação dos compostos, suprimindo ou enriquecendo o sinal analítico, é denominada de efeito matriz (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). A ocorrência e a intensidade do Efeito Matriz podem variar dependendo do caráter da matriz e do analito, e da razão entre analito e matriz (GONZÁLEZ *et al.*, 2008 e JALONEN *et al.*, 2007).

O efeito matriz em GC pode ocorrer no injetor, na coluna e no detector. Estudos sobre efeito matriz relacionado ao injetor são mais freqüentes, por outro lado há poucos estudos na literatura que associam esse efeito à coluna e ao detector, mas se tem conhecimento que as conexões entre injetor e coluna, e as conexões entre coluna e detector também podem promover o efeito matriz (PINHO *et al.*, 2009).

Sítios ativos no injetor (no tubo de vidro - insensor) o qual adsorve e/ou induz degradação térmica de certos analitos, são as principais fontes de enriquecimento de efeito matriz (SHENCK e LEHOTAY, 2000). O insensor é formado por grupos silanóis livres e metais. Até mesmo insensores de alta qualidade possuem estas características. Sítios ativos adicionais podem se originar a partir de co-extratos não voláteis das amostras que se depositam durante repetidas análises (HAJSLOVA *et al.*, 2003). Com isso a quantidade do analito introduzida na coluna é baixa quando preparado em solvente comparado à injeção realizada na presença da matriz. Impurezas são mais abundantes na matriz e competem efetivamente pelos sites ativos com os analitos e isso reduz as interações e conseqüentemente perdas no injetor. Dessa forma, quando a calibração em solvente é usada a superestimação dos resultados pode ocorrer. Mudanças na temperatura do injetor também podem

afetar diferentemente o efeito de matriz. Em temperaturas mais altas, a adsorção tanto dos analitos como dos extrativos na superfície do insertor é reduzida. Em contrapartida, acelera a decomposição de compostos termicamente lábeis (ERNEY *et al.*, 1993 e POOLE, 2007 apud PINHO *et al.* 2009).

Quando se faz uso de uma coluna capilar nova, inicialmente pouco ou nenhum efeito matriz é observado, após a realização de várias análises o efeito matriz começa a aparecer em razão das sucessivas injeções e contaminação do sistema cromatográfico (PINHO *et al.* 2009). O diâmetro interno da coluna também tem influência na magnitude do efeito matriz em uma análise (SHENCK e LEHOTAY, 2000). Normalmente, colunas de maior diâmetro interno apresentam maiores distorções dos resultados em relação às de diâmetros menores (DOMOTOROVA *et al.*, 2006 apud PINHO *et al.* 2009).

Várias precauções podem ser usadas para eliminar ou reduzir o efeito matriz: a) uso de padrões preparados em brancos da matriz, (b) uso do método de adição padrão, (c) extensiva limpeza para reduzir componentes da matriz, (d) uso de padrões internos, com tempos de retenção próximos ou idênticos aos do analito, afetados similarmente aos analitos pelos componentes da matriz, (e) uso de *on-column* ou outras formas de injeção em GC para evitar o efeito de sítios ativos, (f) colocar componentes da matriz com a tentativa de preencher os sítios ativos, (g) compensação dos resultados calculados pelo fator de enriquecimento da matriz. O uso de insertores desativados e/ou técnicas de injeção alternativas, como *splitless* pulsado ou *on-column*, pode ser muito efetivo na redução do efeito, mas são mais caras, e a baixa de robustez faz essas técnicas menos populares (SHENCK e LEHOTAY, 2000). Já o método de adição padrão tem a desvantagem de ser necessário uma curva analítica para cada amostra (PINHO *et al.* 2009). O uso de padrões preparados em extratos dos brancos é a opção mais comum utilizada pelos laboratórios para resolver o problema de efeito matriz.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de método para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel empregando GC-FID.

### 4.1 Instrumentação

- ❖ GC-2010 Shimadzu equipado com auto injetor AOC-20i, injetor on-column, técnica de injeção simple on-column, e Detector de Ionização em chama (FID);
- ❖ GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu equipado com injetor split/splitless;
- ❖ Colunas capilares de sílica fundida: HT5 - 5% fenil polisiloxano – carborano marca SGE com dimensões 25 m x 0,32 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme; Rtx® - 5 MS marca Restek com dimensões 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme;
  - ❖ Aquisição de dados pelo software GC solution Shimadzu;
  - ❖ Balança Analítica Bioprecisa modelo FA 2104N;

### 4.2 Reagentes, solventes e materiais

- ❖ Glicerol, pureza  $\geq 99,5\%$ ;
- ❖ Tricaprina (1,2,3 – tridecanolilglicerol) (padrão interno), pureza 99%, Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Monooleína (1-mono[cis-octadecenoil] –glicerol), pureza ~99%, Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Monopalmitina (1-monoheptadecanoil-rac-glicerol), pureza ~99%, Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Monoestearina (1-monooctadecanoil-rac-glicerol), pureza  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Monolinoleína (1-([cis,cis]-9,12-octadecadienoil)-rac-glicerol) ~99% Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Dioleína (1,3-di[cis-octadecenoil]-glicerol), pureza 99%, Sigma-Aldrich, EUA;

- ❖ Trioleína (glicerol trioleato)  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, EUA.;
- ❖ (S) -(-)-1,2,4- butanotriol (padrão interno), pureza  $\geq 95\%$  GC, Fluka, EUA;
- ❖ N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Metil laurato, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil tridecanoato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil tetradecanoato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil pentadecanoato, pureza 99,6%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil hexadecanoato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil heptadecanoato, pureza 99,8%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil linolenato pureza, 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil octadecanoato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil nonadecanoato, pureza 97,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil araquidato, pureza 99,8%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil heneicosanoato, pureza 99,6%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil docosanoato, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil tricosanoato, pureza 99,8%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil lignocerato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil miristoleato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil palmitoleato, pureza 99,5%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil linoleato, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil eicosaenoato, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil elaidato, pureza 96,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil docosahexaenoato, pureza 99,5%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil nervonato, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil oleato, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil 2-hidróxi estearato, pureza 99%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil eicosatetrenoato, pureza 98,5%, Supelco, EUA;
- ❖ Metil 12-hidróxitetracosanoato, pureza 98%, Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Metil lesquerolato, pureza 99%, Sigma-Aldrich, EUA;
- ❖ Piridina, solvente grau HPLC e espectrofotométrico, J.T.Baker, EUA;
- ❖ Heptano, solvente HPLC e espectrofotométrico, J.T.Baker, EUA;
- ❖ Hexano, solvente HPLC e espectrofotométrico, J.T.Baker, EUA;
- ❖ Extran® neutro (Merk, Brasil);

- ❖ Gás hidrogênio para GC, pureza 99,999%;
- ❖ Gás nitrogênio para GC, pureza 99,999%;
- ❖ Ar sintético para GC, pureza 99,999%;
- ❖ Gás hélio para GC, pureza 99,999%;
- ❖ Micro-seringas de vidro com capacidade de 50  $\mu\text{L}$  e 250  $\mu\text{L}$ , Hamilton CO., Reno, Nevada, EUA;
- ❖ Balões volumétricos com capacidade de 10 mL;
- ❖ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 - 5000 $\mu\text{L}$ ) (Labmate, Polônia, Digipet);
- ❖ Pipetas Pasteur;
- ❖ Frascos para amostrador automático;
- ❖ Frasco âmbar com capacidade de 30 mL com tampa;

### 4.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque individuais dos ésteres para determinação da composição química do biodiesel da mistura de sebo e soja foram preparadas na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>, e através de diluições sucessivas foram preparadas novas soluções individuais de 100 e 10 mg L<sup>-1</sup>. E a partir das soluções individuais de 100 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas duas misturas: uma de todos os ésteres saturados e o metil linolenato e outra de todos os ésteres insaturados; nas concentrações de 4 mg L<sup>-1</sup>. O solvente utilizado no preparo das soluções foi o n-hexano.

As soluções estoque (Tabela 8) e as soluções trabalho (Tabela 9) de glicerol, glicerídeos e os respectivos padrões internos foram preparadas conforme método de referência ASTM D 6584.



**Tabela 8 – Preparo das soluções estoque**

Composto	Massa (mg)	Balão volumétrico (mL)	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )
Glicerol	25	50	0,5
Monooleína	50	10	5
Dioleína	50	10	5
Trioleína	50	10	5
(S)-(-)-1,2,4 butanotriol	25	25	1
Tricaprina	80	10	8

As soluções trabalho (Tabela 9), 1º nível ao 5º nível de concentração das curvas analíticas dos compostos, foram preparadas diariamente a partir das soluções estoque.

**Tabela 9 – Volumes, em µL, das soluções estoque para preparo das curvas analíticas de cada composto**

Composto	Volumes em µL do 1º ao 5º nível de concentração				
	1º	2º	3º	4º	5º
Glicerol	10	30	50	70	100
Monooleína	20	50	100	150	200
Dioleína	10	20	40	70	100
Trioleína	10	20	40	70	100
(S)-(-)-1,2,4 butanotriol	100	100	100	100	100
Tricaprina	100	100	100	100	100

Os procedimentos adotados para o preparo dos níveis das curvas analíticas foram: para medida de volumes inferiores a 40  $\mu\text{L}$  foi utilizada microseringa de vidro de 50  $\mu\text{L}$ ; para volumes superiores ou iguais a 50  $\mu\text{L}$  foi utilizada microseringa de 250  $\mu\text{L}$ . Após colocar em frascos âmbar volumes adequados dos padrões para todos os níveis foi adicionado a cada frasco 100  $\mu\text{L}$  de MSTFA com micropipetador automático de 100  $\mu\text{L}$ , com posterior agitação.

Foi deixado ocorrer a reação de sililação por 20 minutos sendo na seqüência adicionados duas vezes 4mL de n-heptano com micropipetador automático de 5000  $\mu\text{L}$ .

#### **4.4 Amostras de biodiesel**

As amostras de biodiesel utilizadas para validação do método foram produzidas nos laboratórios de Química Orgânica da FURG. Elas consistiram de biodiesel etílico de: girassol, mamona e da mistura de sebo e soja. Estas amostras foram sempre utilizadas com no máximo dois meses após a sua produção. A amostragem foi realizada de forma aleatória.

#### **4.5 Preparo das amostras para determinação da composição química do biodiesel da mistura de sebo e soja**

As amostras foram diluídas mil vezes em n-hexano para posterior injeção no GC-MS.

#### **4.6 Otimização da reação de sililação para o biodiesel etílico de mamona**

A reação de sililação foi otimizada apenas para o biodiesel de mamona em virtude da sua composição química.

Em 100 mg de amostra foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de tricaprina. Após a amostra foi sililada com um volume de 100  $\mu\text{L}$  de MSTFA conforme indicado pelo método ASTM

D 6584 para outros tipos de biodiesel. Posteriormente foi testado o uso de 500  $\mu\text{L}$  de MSTFA.

Após colocar o reagente derivatizante a amostra foi agitada e o tempo de reação de silição foi de 20 minutos, na seqüência foram adicionados 8 mL de n-heptano.

Nesses ensaios foram adotados procedimentos como: para volumes de 100  $\mu\text{L}$  dos padrões internos foi utilizada micro-seringa de 250  $\mu\text{L}$ ; para volumes de 100  $\mu\text{L}$  e 500  $\mu\text{L}$  MSTFA foram utilizados micropipetadores automáticos de 100 e 1000  $\mu\text{L}$ , respectivamente; e para volumes de 8 mL (2x 4mL) n-heptano foi utilizado micropipetador automático de 5000  $\mu\text{L}$ .

#### **4.7 Composição química do biodiesel etílico da mistura de sebo e soja (20/80%)**

Antes da determinação dos contaminantes no biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) nos métodos ASTM D6584 e EN 14105, a composição química desse biodiesel foi determinada por GC-MS.

As soluções individuais dos ésteres de 10 mg L<sup>-1</sup> foram injetadas, no GC-MS para identificar os tempos de retenção e os espectros dos mesmos. Após foram injetadas as duas misturas: uma de todos os ésteres saturados e o metil linolenato e outra de todos os ésteres insaturados; nas concentrações de 4 mg L<sup>-1</sup> para determinação da composição química da amostra de biodiesel. Normalização de áreas foi o método utilizado para determinação da porcentagem de cada constituinte na amostra.

As condições utilizadas no sistema GC-MS foram: coluna capilar de sílica fundida Rtx® - 5 MS marca Restek com dimensões 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme; volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ ; forno a 80 °C por 1 min, 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, 7 °C min<sup>-1</sup> até 330 °C por 1 min; injetor *split/splitless* com modo de injeção *splitless* e temperatura de 250 °C; gás de arraste hélio com velocidade linear de 42 cm seg<sup>-1</sup>; temperatura de 230 °C na fonte de íons; temperatura na interface de 280 °C; Detecção por Espectrometria de Massas com ionização por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV e varredura de massas 29 a 500 *m/z*.

#### 4.8 Sistema cromatográfico GC-FID

O sistema de cromatografia adotado para análise de glicerol livre e total, mono, di e triglicerídeos foi baseado nos métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105. Foram realizadas injeções das amostras e dos níveis de concentração dos padrões nas condições cromatográficas dos dois métodos, com o objetivo de selecionar a rampa de temperatura que proporcionasse menor tempo de análise sem comprometer a separação entre glicerol, ésteres e glicerídeos.

Para ambos os métodos foram utilizados: coluna capilar de sílica fundida HT5 - 5% fenil polisiloxano – carborano marca SGE, com dimensões 25 m x 0,32 mm d.i., 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura do filme; volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ ; gás de arraste  $\text{H}_{2(\text{g})}$  com velocidade linear de 50  $\text{cm s}^{-1}$ ; injetor *on-column* com técnica de injeção *simple on-column* e modo de injeção direct; temperatura no injetor 70  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 380  $^{\circ}\text{C}$  por 10,31 min; detector (FID) a 380  $^{\circ}\text{C}$  e com  $\text{H}_{2(\text{g})}$  a 40  $\text{mL min}^{-1}$ , ar sintético a 400  $\text{mL min}^{-1}$  e  $\text{N}_{2(\text{g})}$  como gás make up a 30  $\text{mL min}^{-1}$ .

Os métodos se distinguem na programação de temperatura do forno cromatográfico, ASTM D 6584: 50  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, 15  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 180  $^{\circ}\text{C}$ , 7  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 230  $^{\circ}\text{C}$ , 30  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 380  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min; EN 14105: 50  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, 15  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 180  $^{\circ}\text{C}$ , 7  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 230  $^{\circ}\text{C}$ , 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 370  $^{\circ}\text{C}$  por 12 min.

#### 4.9 Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos

Para identificação e quantificação dos monoglicerídeos foram feitas soluções individuais e mistura no terceiro nível de concentração ASTM D 6584 de monopalmitina, monoestearina, monooleína, e monolinoleína a partir das soluções estoque de 5  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Para amostras de biodiesel etílico de girassol e da mistura de sebo:soja (20:80) a identificação e quantificação dos monoglicerídeos foi realizada através da sobreposição dos cromatogramas das amostras e da mistura de monoglicerídeos.

No caso do biodiesel etílico de mamona foi feita a sobreposição dos cromatogramas da amostra de biodiesel etílico de girassol, da amostra de biodiesel etílico de mamona e da mistura dos monoglicerídeos.

Para os diglicerídeos e triglicerídeos foram estabelecidas bandas de tempos de retenção através da sobreposição de cromatogramas. Para amostras de biodiesel etílico de girassol e da mistura de sebo:soja (20:80) essas bandas foram estabelecidas através da sobreposição dos cromatogramas dessas amostras e do quinto nível de concentração dos padrões.

Para o biodiesel etílico de mamona foi feita sobreposição dos cromatogramas da amostra de biodiesel etílico de girassol, da amostra de biodiesel etílico de mamona e do quinto nível de concentração dos padrões.

O estabelecimento das bandas de diglicerídeos e triglicerídeos consideraram um conjunto de três picos referentes à C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2 para as amostras de biodiesel etílico de girassol e da mistura de sebo e soja. Para as amostras de biodiesel etílico de mamona foram considerados os mesmos picos com acréscimo dos picos referentes à C18:1-OH.

#### 4.9.1 GC-MS para confirmação dos compostos

Apenas para a amostra de biodiesel etílico de mamona foi necessária análise por GC-MS. Foram injetadas no sistema GC-MS a amostra do biodiesel etílico de mamona e o terceiro nível de concentração dos padrões.

As condições utilizadas no sistema GC-MS foram: coluna capilar de sílica fundida HT5 - 5% fenil polisiloxano – carborano marca SGE, com dimensões 25 m x 0,32 mm d.i., 0,1 µm de espessura do filme; volume de injeção de 1 µL; forno a 50 °C por 1 min, 15 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, 7 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C e 30 °C min<sup>-1</sup> até 350 °C por 30 min; injetor *split/splitless* com modo de injeção *split*, razão de *split* 1:50 e temperatura de 250 °C; gás de arraste hélio com velocidade linear de 64,7 cm seg<sup>-1</sup>; temperatura de 250 °C na fonte de íons; temperatura na interface de 320 °C; detecção por Espectrometria de Massas com ionização por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV e varredura de massas 70 a 1090 *m/z*.

#### 4.10 Cálculo para quantificação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel

O conteúdo de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos nas amostras de biodiesel foi calculado com o auxílio do software GC Solution.

Após observar que nas curvas analíticas para todos compostos foi obtida boa linearidade, no software foi alterado o tipo de curva de linear para “manual RF linear”. O RF (fator de correção) dado para a monooleína foi copiado para os demais monoglicerídeos, assim o RF da dioleína foi copiado para os demais diglicerídeos e o RF da trioleína foi copiado para os demais triglicerídeos. Com isso foi possível quantificar os demais glicerídeos tendo somente curvas analíticas da monooleína, dioleína e trioleína.

O software forneceu a razão entre a concentração de cada composto e a concentração do respectivo padrão interno na amostra, para determinar a concentração de cada composto o valor dado foi substituído na Equação (4).

$$\text{Conc composto} = \frac{\text{conc composto}}{\text{conc PI}} \times \text{conc do PI} \quad (4)$$

A partir da Equação (4) foi determinada a concentração de glicerol livre, mono-, di e triglicerídeos nas amostras.

Os valores encontrados na Equação (4) foram substituídos na Equação (5) para determinar o conteúdo de glicerol total.

$$\text{Glicerol total \% (m / m)} = \text{glicerol livre} + 0,2591 \text{ monoglicerídeos} + 0,1488 \text{ diglicerídeos} + 0,1044 \text{ triglicerídeos} \quad (5)$$

#### 4.11 Validação do método

#### 4.11.1 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas para os compostos foram construídas conforme descrito no item 4.3 páginas 46 a 48, e na Tabela 10 são apresentados os cinco níveis de concentração de cada composto.

**Tabela 10 – Níveis de concentração, % (m/m), para os compostos segundo ASTM D 6584**

Composto	1º	2º	3º	4º	5º
Glicerol	0,005	0,015	0,025	0,035	0,05
Monooleína	0,1	0,25	0,50	0,75	1
Dioleína	0,05	0,1	0,2	0,35	0,5
Trioleína	0,05	0,1	0,2	0,35	0,5

Foi empregada padronização interna sendo o (S)-(-)-1,2,4 butanotriol o padrão interno do glicerol e a tricaprina o padrão interno dos glicerídeos, nas concentrações de 0,1 e 0,8 %, respectivamente (m/m).

Cada nível de concentração foi injetado três vezes no sistema cromatográfico. A partir disso o software construi a curva analítica para cada composto relacionando a razão de áreas (área do padrão/área do padrão interno) com a razão das concentrações (concentração do padrão/concentração do padrão interno). Com base nas curvas analíticas foi avaliada a linearidade do método para cada composto através do coeficiente de Pearson ( $r$ ).

#### 4.11.2 Sensibilidade

A sensibilidade dos métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 foi comparada através do coeficiente angular da equação de reta de cada composto, sendo que quanto maior o coeficiente angular mais sensível é o método.

#### 4.11.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada para o biodiesel etílico de mamona devido à modificação da reação de silição para esse biodiesel.

O estudo da precisão do método em termos de repetitividade e precisão intermediária foi realizado para o 1º nível, 3º nível e 5º nível de concentração através da fortificação da amostra com os compostos, foram efetuados três ensaios para cada nível com posterior injeção em triplicata no GC-FID para cada ensaio. Para avaliar a precisão intermediária esse procedimento foi efetuado em dois dias diferentes.

A precisão instrumental foi avaliada para os cinco níveis de concentração da curva analítica de cada composto, considerando três injeções repetitivas de um mesmo ensaio.

A precisão foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), Equação (6).

$$\text{RSD}\% = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (6)$$

#### 4.11.4 Exatidão

A exatidão foi verificada pelo método de adição padrão e por ensaios de recuperação. O método de adição padrão foi utilizado para compostos que estavam presentes na matriz (ou seja, caso em que a matriz não estava isenta dos compostos de interesse). O ensaio de recuperação foi usado no caso em que a matriz estava isenta do composto de interesse. Baseado nisso, a exatidão para o glicerol, monoléina e dioléina foi avaliada pelo método de adição padrão, e para a trioléina foi utilizado ensaios de recuperação.

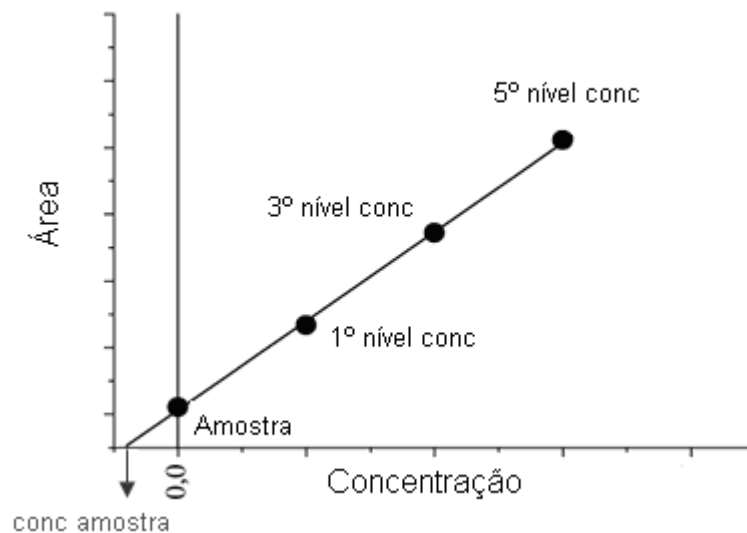
Ao considerar que a exatidão está sempre associada a precisão, ambas foram avaliadas de forma concomitante, ou seja, para os mesmos níveis de concentração e para a mesma amostra: biodiesel etílico de mamona.

Para avaliação da exatidão pelo método de adição o ideal é ter um material de referência acompanhado de um certificado com o valor da concentração de cada composto de interesse no biodiesel. A partir disso os sinais medidos e o valor da



concentração dado pelo material de referência para cada composto é aplicado diretamente nas Equações (7) e (8). Como nesse caso isso não foi possível a concentração de cada composto na amostra não fortificada foi determinada através do método de adição padrão para posterior cálculo da exatidão. Ao considerar que esses valores de concentração encontrados para os compostos na amostra não fortificada foram utilizados como referência para o cálculo da exatidão; para garantir a confiabilidade esses valores foram também determinados através das curvas analíticas e comparados àqueles determinados pelo método de adição padrão.

O método de adição padrão foi realizado tendo como base a Figura 10.



**Figura 10 – Modelo de curva utilizado no método de adição padrão**

A concentração encontrada na amostra através da extrapolação da reta, Figura 10, no eixo das abscissas foi definido como a concentração na amostra não fortificada e foi substituído na Equação (7).

$$\text{Conc det amostra fortificada} = \frac{\text{conc amostra não fortificada} \times (\text{área amostra fortificada} - \text{área amostra não fortificada})}{\text{área amostra não fortificada}} \quad (7)$$

Após o valor encontrado foi substituído na Equação (8).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{conc determinada na amostra fortificada}}{\text{concentração da fortificação}} \times 100 \quad (8)$$

Logo, quando o padrão interno foi considerado no cálculo da exatidão a reta, Figura 10, relacionou a razão de áreas (área do padrão/área do padrão interno) com a razão das concentrações (concentração do padrão/concentração do padrão interno). E a Equação (7) também considerou as razões de áreas e de concentrações entre padrão e padrão interno, onde o valor encontrado foi multiplicado pela concentração do padrão interno.

Nos ensaios de recuperação o valor de área medido foi substituído nas equações de reta das curvas analíticas no solvente e na matriz de forma a obter a concentração na amostra fortificada ( $C_1$ ). Após foram expressos conforme Equação (9).

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (9)$$

onde:

$C_1$ = concentração determinada na amostra fortificada

$C_2$ = concentração determinada na amostra não fortificada

$C_3$ = concentração da fortificação

#### 4.11.5 Robustez

A robustez foi avaliada frente à variação da matriz. Visto que os métodos de referência são indicados para ésteres metílicos oriundos de óleo de colza, girassol, soja ou ésteres de composição química semelhante a esses; e o estudo foi realizado com biodiesel de mamona, que apresenta composição química distinta desses ésteres, e com biodiesel etílico.

#### 4.12 Avaliação do efeito matriz

A avaliação da ocorrência ou não do efeito matriz foi realizada para o biodiesel etílico de mamona. Para isso foram construídas curvas no solvente e na matriz.

As curvas na matriz foram preparadas da seguinte forma: em 100 mg de amostra foram adicionados volumes adequados das soluções estoque dos padrões para resultar em cinco níveis de concentração, e volumes constantes das soluções

estoque dos padrões internos, conforme ASTM D 6584. Após foi realizada reação de siliilação com 500 µL de MSTFA com tempo de reação de 20 minutos, com posterior adição de 8 mL de n-heptano.

O efeito matriz foi calculado através da Equação (11) conforme ECONOMOU *et al.* (2009).

$$C\% = 100 \times \left( 1 - \frac{S_m}{S_s} \right) \quad (11)$$

onde:

C%= Efeito matriz

S<sub>m</sub>= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto, preparadas no biodiesel etílico de mamona

S<sub>s</sub>= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto, preparadas em heptano (solvente)

O efeito matriz é considerado baixo para uma faixa de supressão/enriquecimento de sinal de  $-20\% < C\% < +20\%$ , médio para faixas de  $-50\% < C\% < -20\%$  ou  $+20\% > C\% > +50\%$  e alto para  $C\% < -50\%$  ou  $C\% > +50\%$  (ECONOMOU *et al.*, 2009).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da reação de sililação para o biodiesel etílico de mamona

O óleo de mamona é constituído em 90% de um triglicerídeo derivado do ácido ricinoléico, o que distingue o biodiesel gerado a partir desse óleo dos demais tipos de biodiesel. Dessa forma, o principal constituinte do biodiesel de mamona e contaminantes mono-, di- e triglicerídeos presentes no mesmo, na sua maioria, são hidroxilados.

A reação de sililação empregada como preparo de amostra pelos métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel ocorre substituindo os hidrogênios ácidos desses compostos pelo grupo trimetilsilil  $((\text{CH}_3)_3\text{Si})$  do agente derivatizante. Esses métodos de referência são indicados para ésteres oriundos de óleo de colza, girassol, soja ou ésteres de composição química semelhante a esses. Como o biodiesel de mamona apresenta composição química distinta desses ésteres, ou seja, principal constituinte e contaminantes hidroxilados, o estudo da reação de sililação se faz necessário.

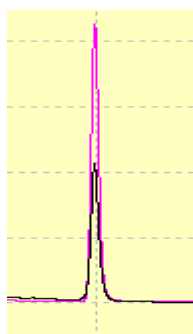
Na otimização da reação de sililação para o biodiesel etílico de mamona o fator tido como indicativo de uma reação completa foi a altura do pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol. Estudos iniciais que foram base para os métodos de referência relatam o padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol como o indicador mais sensível de uma incompleta reação de sililação (PLANK e LORBEER, 1995). No caso de sililação insuficiente os três grupos hidroxilas do padrão interno não são sililados e seu pico se apresenta dividido e com uma redução drástica na altura.

Baseado nisso, primeiramente foi sililada uma amostra de biodiesel metílico de girassol, para a qual o método ASTM D 6584 é indicado, determinando a altura do pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol como indicativo de uma reação completa; e desse

modo como referência para o estudo dessa mesma reação para o biodiesel de mamona.

No primeiro ensaio para o biodiesel etílico de mamona foi feita derivatização segundo ASTM D 6584, utilizando 100  $\mu$ L de MSTFA.

Ao comparar, Figura 11, a altura do pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol na reação de sililação com 100  $\mu$ L de MSTFA para o biodiesel de mamona com a altura do pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol tida como referência foi verificada uma reação de sililação incompleta.

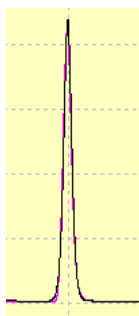


**Figura 11 – Em rosa pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (referência) e preto pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (biodiesel de mamona derivatizado com 100  $\mu$ L de MSTFA)**

Em virtude da presença de mais hidrogênios aptos a sofrerem reação de sililação foi avaliada a influência do uso de um volume maior de MSTFA na reação de sililação.

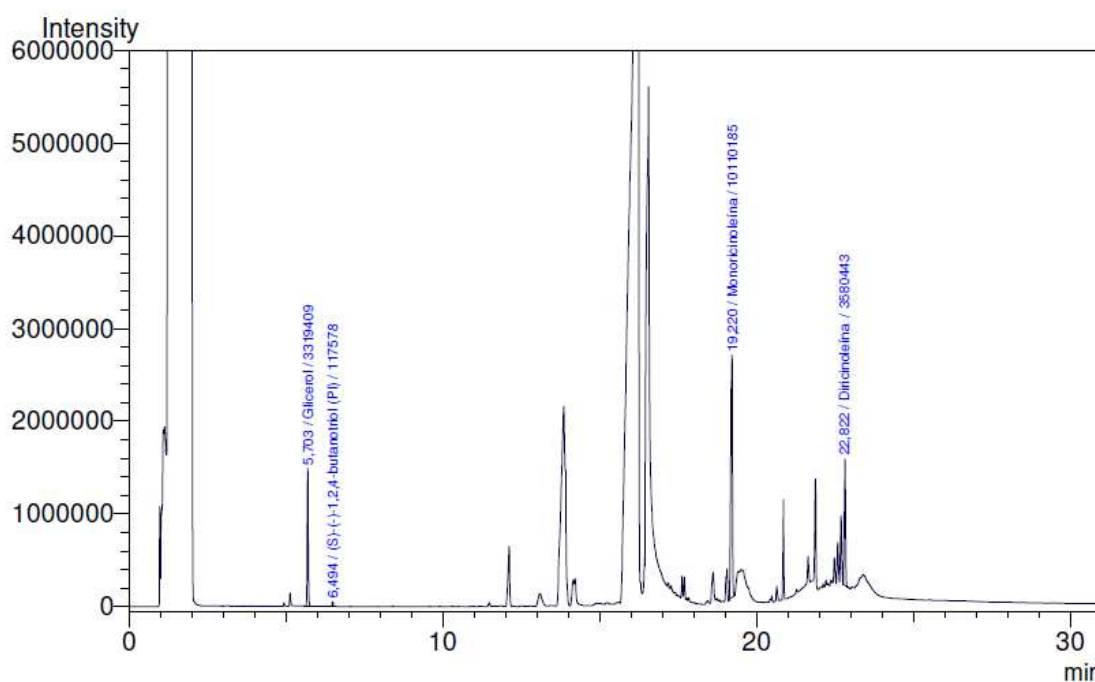
Com a utilização de um volume de 500  $\mu$ L MSTFA a altura do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol foi aproximadamente o dobro comparada a altura obtida com o volume de 100  $\mu$ L de MSTFA.

Logo, com um volume de 500  $\mu$ L de MSTFA o pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol se sobrepôs totalmente ao pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol tido como referência, Figura 12. Isso é um indicativo que a reação de sililação ocorreu de forma completa para o biodiesel de mamona nessas condições. Desse modo, um volume de 500  $\mu$ L de MSTFA para a reação sililação foi escolhido para continuação do estudo.

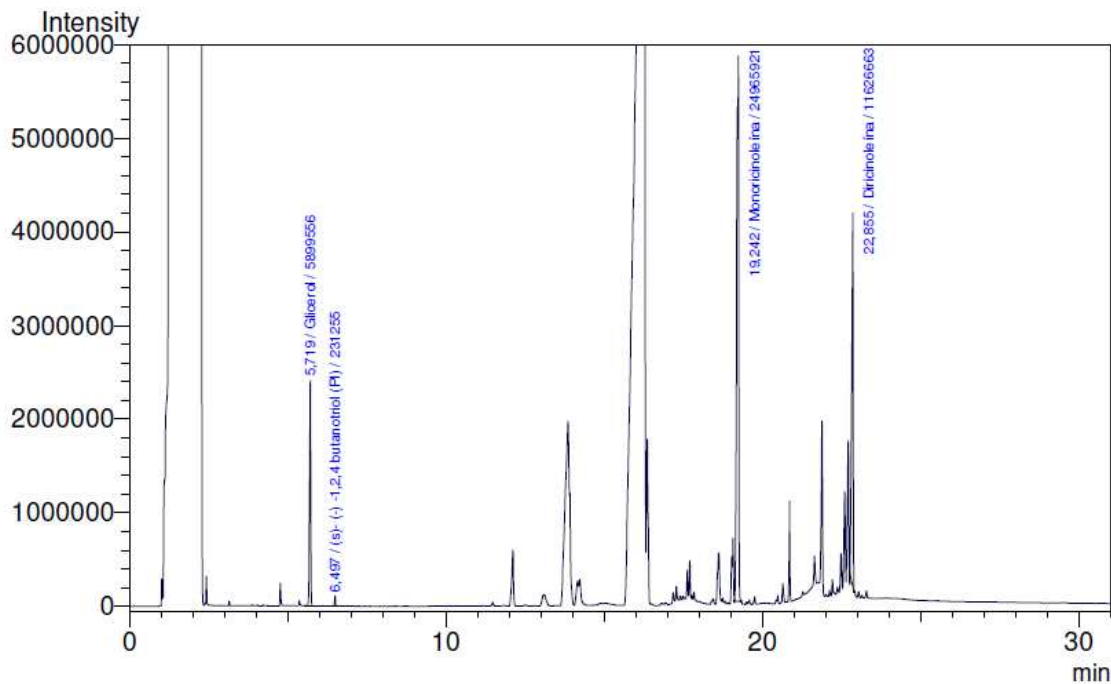


**Figura 12 – Em rosa pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (referência) e preto pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (biodiesel de mamona derivatizado com 500  $\mu$ L de MSTFA)**

Com base nos parâmetros de identificação para monoricinoleína e 1,3-diricinoleína posteriormente estabelecidos no item 5.4 deste trabalho, esses compostos foram identificados nos cromatogramas dos ensaios utilizando 100 e 500  $\mu$ L de MSTFA. A partir disso foi realizada a comparação das áreas do glicerol, (S)-(-)-1,2,4-butanotriol, monoricinoleína e 1,3-diricinoleína utilizando 100 e 500  $\mu$ L de MSTFA. Nas Figuras 13, 14 e na Tabela 11 a seguir apresentadas foram destacadas as áreas desses compostos.



**Figura 13 - Perfil cromatográfico do biodiesel etílico de mamona derivatizado com 100  $\mu$ L de MSTFA**



**Figura 14 - Perfil cromatográfico do biodiesel etílico de mamona derivatizado com 500 µL de MSTFA**

Como pode ser observado nos cromatogramas e constatado na Tabela 11 com um volume de 500 µL de reagente a área dos compostos aumentou de 1,78 vezes a 3,25 vezes. Isto também leva a concluir que a reação com um volume de 500 µL foi completa.

**Tabela 11 - Relação de áreas dos compostos nas Figuras 13 e 14**

Composto	Figura 1	Figura 2	Razão áreas Fig. 2/Fig.1
Glicerol	3319409	5899556	1,78
(S)-(-)-1,2,4-butanotriol	117578	231255	1,97
Monoricinoleína	10110185	24965921	2,47
1,3 Diricinoleína	3580443	11626663	3,25

Os cálculos estequiométricos abaixo também indicam que é necessário um volume maior que 100 µL de MSTFA para reação silição completa do biodiesel de mamona.

Dados:

Massa de amostra analisada = 100 mg = 0,1 g

Massa molar do ricinoleato de etila = 323 g mol<sup>-1</sup>

Densidade do MSTFA =  $1,075 \text{ g mL}^{-1}$

Massa Molar do MSTFA =  $199,25 \text{ g mol}^{-1}$

$$\begin{array}{l} 0,1 \text{ g de amostra (biodiesel)} \text{ ----- } x \\ 323 \text{ g de biodiesel} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \\ x = 3,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol de biodiesel} \end{array}$$

Ao considerar que: a amostra de biodiesel tem 100% de pureza, um mol de biodiesel de mamona tem um mol de hidrogênio ácido a reagir e que a relação estequiométrica com o MSTFA é 1:1; logo é necessário  $3,1 \cdot 10^{-4}$  mol de MSTFA para uma massa de 0,1 g de biodiesel.

$$\begin{array}{ll} 1 \text{ mol de MSTFA} \text{ ----- } 199,25 \text{ g} & 1,075 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ 3,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol de MSTFA} \text{ ----- } x & 0,062 \text{ g} \text{ ----- } x \\ x = 0,062 \text{ g de MSTFA} & x = 0,0576 \text{ mL} = 57,67 \text{ } \mu\text{L de MSTFA} \end{array}$$

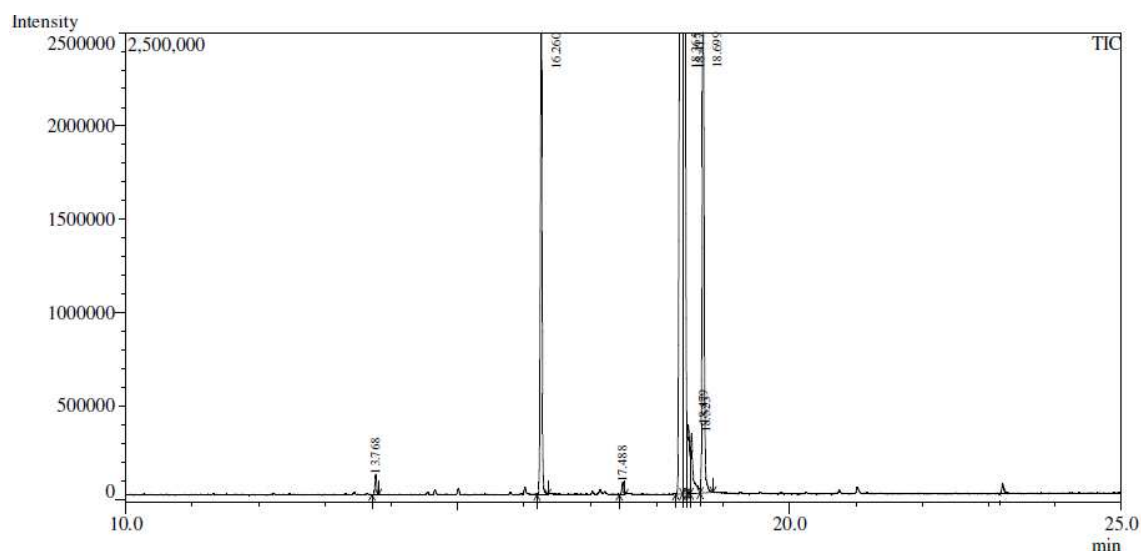
O biodiesel de mamona por ter seu principal constituinte hidroxilado (ricinoleato de etila), faz com esse constituinte concorra na reação de sililação com os contaminantes, glicerol e glicerídeos, e com o padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol. Como pode ser visto nos cálculos acima esse constituinte consome aproximadamente  $58 \text{ } \mu\text{L}$  de MSTFA, restando somente  $42 \text{ } \mu\text{L}$  do reagente para reagir com os contaminantes. Para as demais amostras de biodiesel os métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 indicam  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de MSTFA para os contaminantes e o (S)-(-)-1,2,4-butanotriol. Isso justifica ser insuficiente  $42 \text{ } \mu\text{L}$  de reagente no caso da amostra de biodiesel de mamona, principalmente se considerar que os glicerídeos em maior concentração são hidroxilados, monoricinoleína, 1,3-diricinoleína e ricinoleína. Portanto, os cálculos estequiométricos indicam que um volume maior que  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de MSTFA é necessário para uma reação de sililação completa. Ao utilizar o volume de  $500 \text{ } \mu\text{L}$  de MSTFA selecionado para a seqüência do estudo restam aproximadamente  $440 \text{ } \mu\text{L}$  de MSTFA para reagir com glicerol e glicerídeos, e com o padrão interno. O volume de  $440 \text{ } \mu\text{L}$  de MSTFA utilizado para a amostra de biodiesel de mamona é 4,4 vezes maior que o volume de  $100 \text{ } \mu\text{L}$  indicado para as demais amostras.



## 5.2 Determinação da composição química do biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80)

Os métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 não podem ser aplicados sem modificações a ésteres oriundos de triglicerídeos que possuam em sua constituição graxa o ácido láurico (C12:0), devido às sobreposições de picos de ésteres de longa cadeia com monoglicerídeos de cadeia curta. O sebo por ser uma gordura animal é rico em ésteres derivados de ácidos graxos saturados podendo ter em sua constituição graxa o ácido láurico (C12:0).

Para verificar a presença ou não de éster do ácido láurico no biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) foi determinada a sua composição graxa por GC-MS e os resultados estão mostrados na Figura 15 e Tabela 12. É imprescindível que o perfil graxo seja sempre realizado em amostras da mistura de sebo:soja (20:80) antes da determinação do conteúdo do glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos para assegurar a ausência de ésteres do ácido láurico (C12:0).



**Figura 15 – Perfil cromatográfico da composição química do biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80)**

**Tabela 12 - Composição graxa do biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80)**

Ácido graxo	Tempo de retenção ( $t_R$ ) em minutos	Composição (%)
Ácido Linoléico C18:2	18,3	42,44

Ácido Oléico C18:1	18,4	35,78
Ácido Estearico C18:0	18,6	11,22
Ácido Palmítico C16:0	16,2	9,62
Ácido Mirístico C14:0	13,7	0,38
Ácido Heptadecanóico C17:0	17,4	0,27

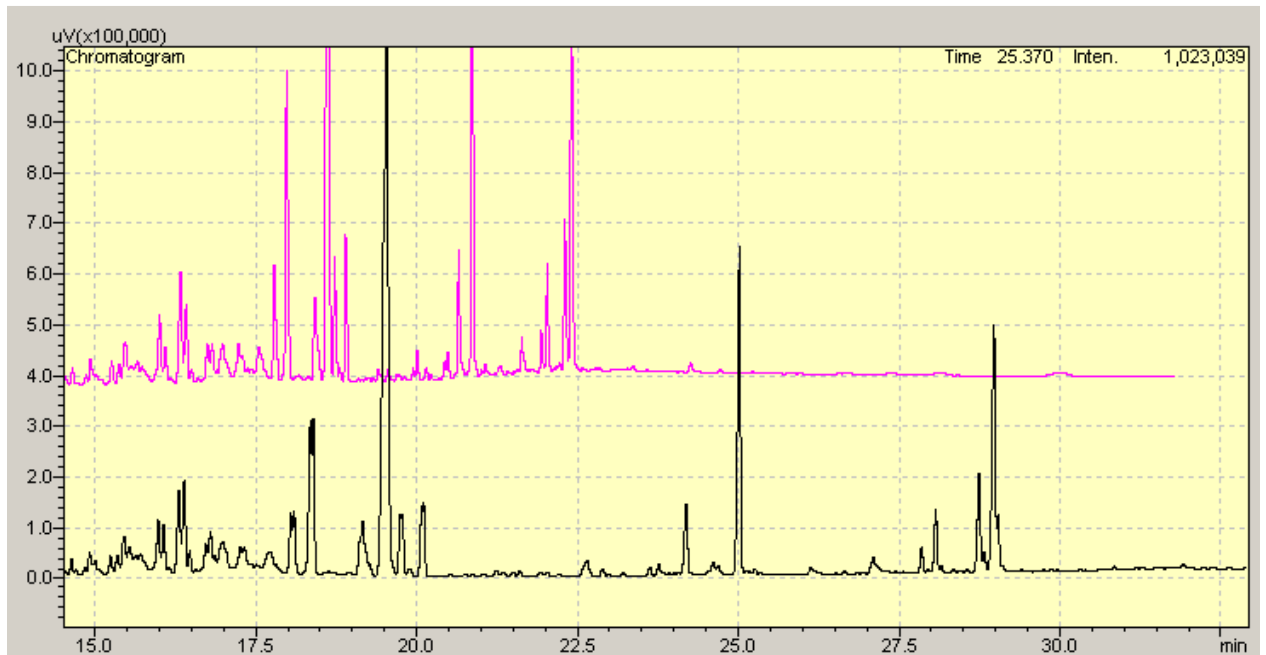
Como pode ser observado em ambos Figura 15 e Tabela 12 éster do ácido láurico não está presente na constituição química no biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80), portanto a amostra não tem restrições para ser analisada pelos métodos de referência.

### 5.3 Condições cromatográficas escolhidas para análise das amostras

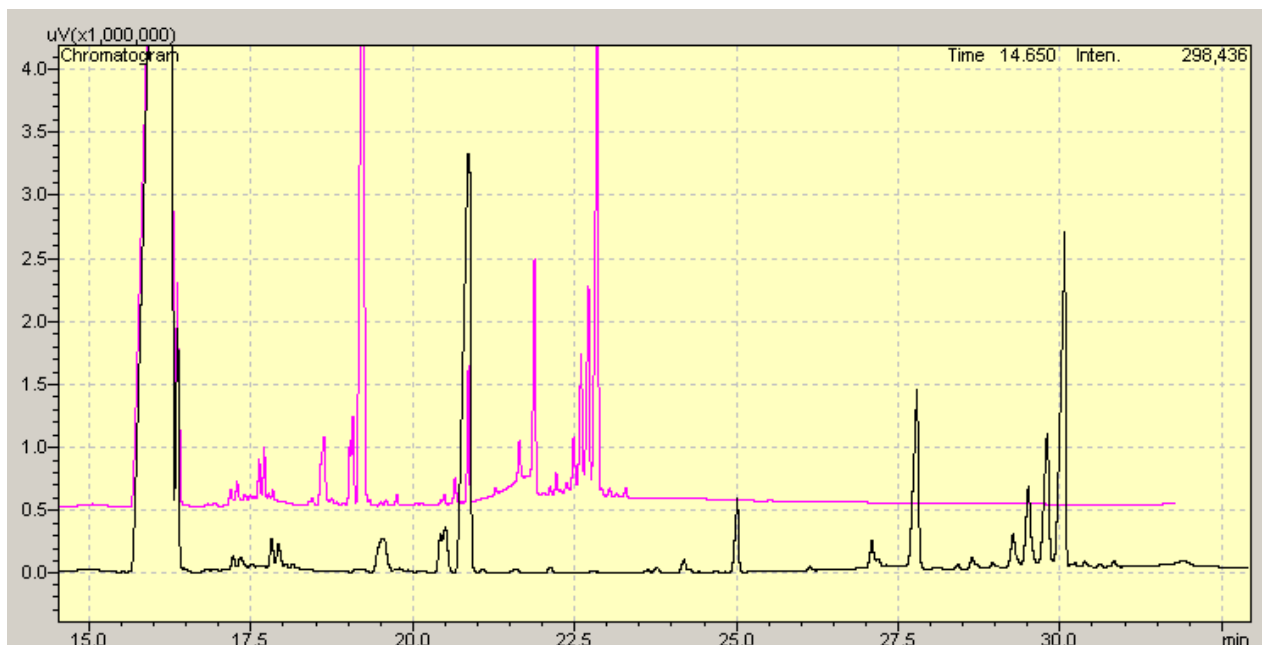
As condições do sistema GC-FID dos métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 são aplicáveis a metil ésteres de girassol, e os ensaios mostraram que eles também podem ser utilizados para biodiesel etílico: de girassol, mamona e da mistura de sebo:soja (20:80).

No caso do biodiesel etílico de mamona que possui composição química distinta do biodiesel etílico de girassol testes com EN 14105 foram considerados importantes. Isso porque o método EN 14105 em comparação com ASTM D 6584 possui aquecimento mais lento para chegar a última temperatura do forno, o que influencia na separação dos ésteres, mono-, di- e triglicerídeos, pois passa a atuar a partir de 16,8 minutos em diante. O biodiesel etílico da mistura de sebo e soja apresentou constituição semelhante ao biodiesel de girassol, no entanto sua constituição tem uma pequena porcentagem de ésteres saturados, por isso ensaios com o método EN 14105 também foram realizados.

O fato de ter apresentado um mesmo perfil cromatográfico para as amostras de biodiesel da mistura de sebo e soja (Figura 16) e biodiesel de mamona (Figura 17) nos dois métodos descartou a possibilidade de coeluição entre os compostos (ésteres, mono-, di- e triglicerídeos) quando foi utilizado o método ASTM D 6584. Uma vez que ao se utilizar um aquecimento mais brando para chegar a última temperatura do forno (EN 14105) o perfil obtido foi semelhante àquele obtido com um aquecimento mais rápido (ASTM D 6584).



**Figura 16 – Perfil cromatográfico do biodiesel etílico da mistura de sebo e soja (20/80%) nas condições de análise do método EN 14105 (em preto) e do método ASTM D 6584 (em rosa)**



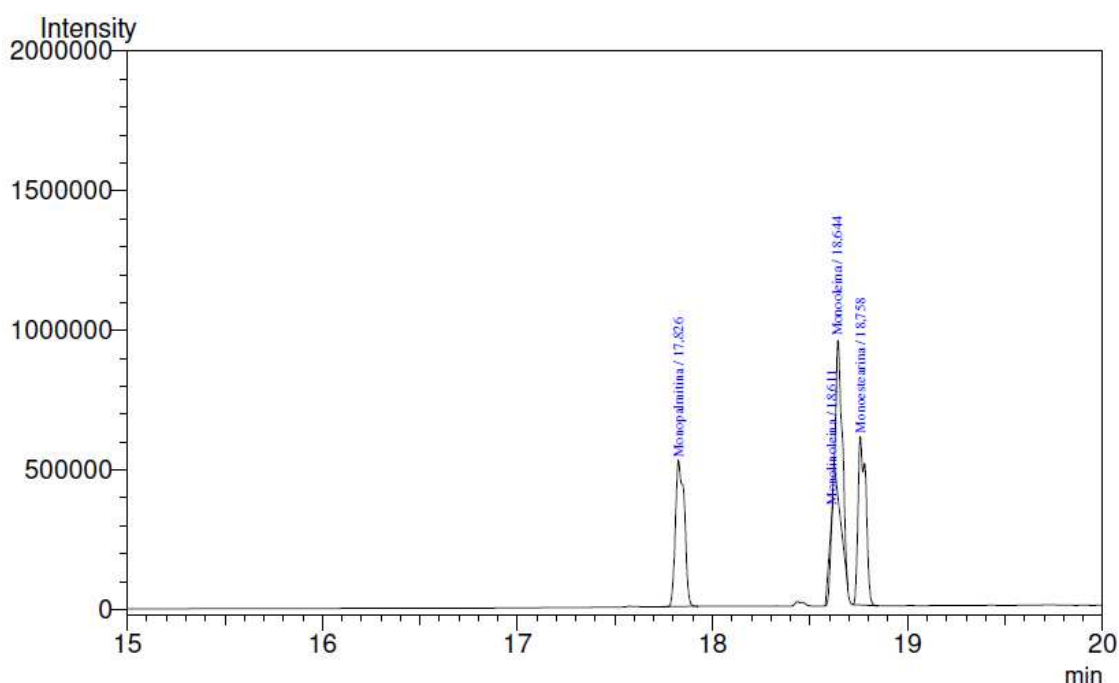
**Figura 17 – Perfil cromatográfico do biodiesel etílico de mamona nas condições de análise do método EN 14105 (em preto) e do método ASTM D 6584 (em rosa)**

Portanto, por ser indiferente a eluição das amostras no método EN 14105 ou no método ASTM D 6584, foi escolhida a programação de temperatura do forno do método ASTM D 6584 por resultar em um tempo de corrida cromatográfica menor. O método ASTM D 6584 tem um tempo de análise de 31,81 minutos e o EN 14105 de 42,81 minutos; o primeiro é onze minutos mais rápido. Isso porque o método ASTM D 6584 utiliza como último incremento de temperatura  $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $380\text{ }^{\circ}\text{C}$  e o EN 14105 emprega  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $370\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.4 Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos

A ordem de eluição dos mono-, di- e triglicerídeos nas condições utilizadas está relacionada com o número de carbonos, aqueles com mesmo número de carbonos e com duplas ligações coeluem, já os saturados e insaturados que possuem mesmo número de carbonos são separados, eluindo primeiro os insaturados.

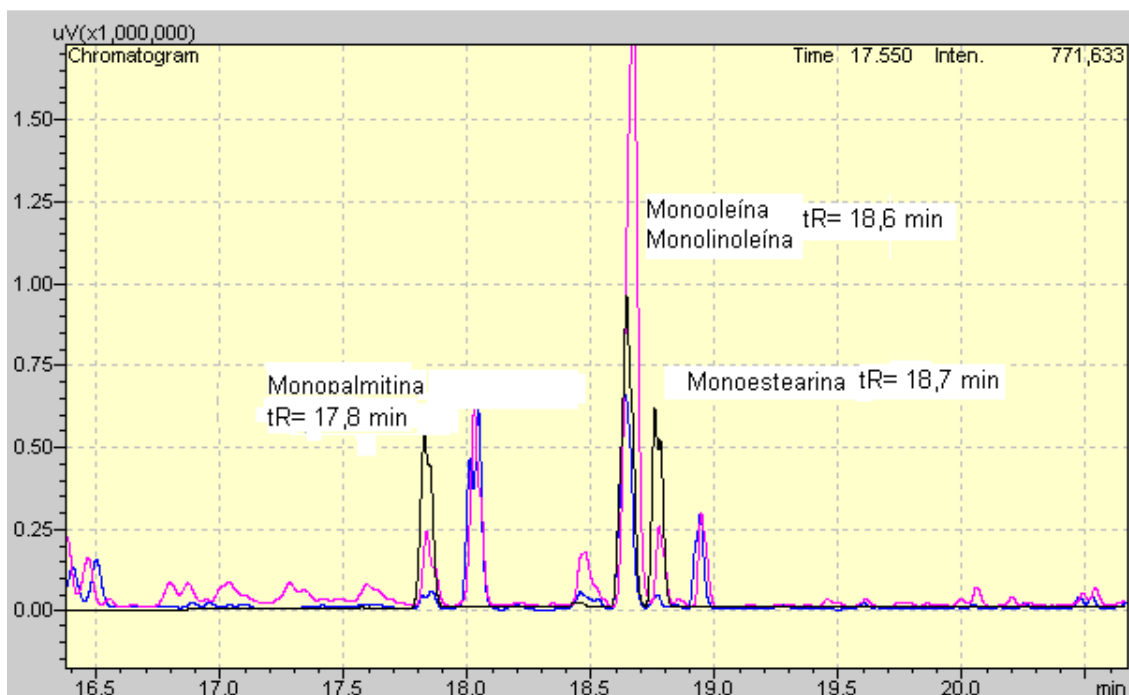
Na Figura 18 é apresentado o cromatograma da mistura dos monoglicerídeos: monopalmitina, monoestearina, monooleína, e monolinoleína.



**Figura 18 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da mistura dos padrões dos monoglicerídeos sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

Monooleína e monolinoleína coeluem como já explicado anteriormente, o mesmo ocorreu em cromatogramas de amostras apresentados nos métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105.

Na Figura 19 foi feita a sobreposição dos padrões dos monoglicerídeos e das amostras de biodiesel de girassol e da mistura de sebo e soja identificando os compostos através dos tempos de retenção para posterior quantificação.

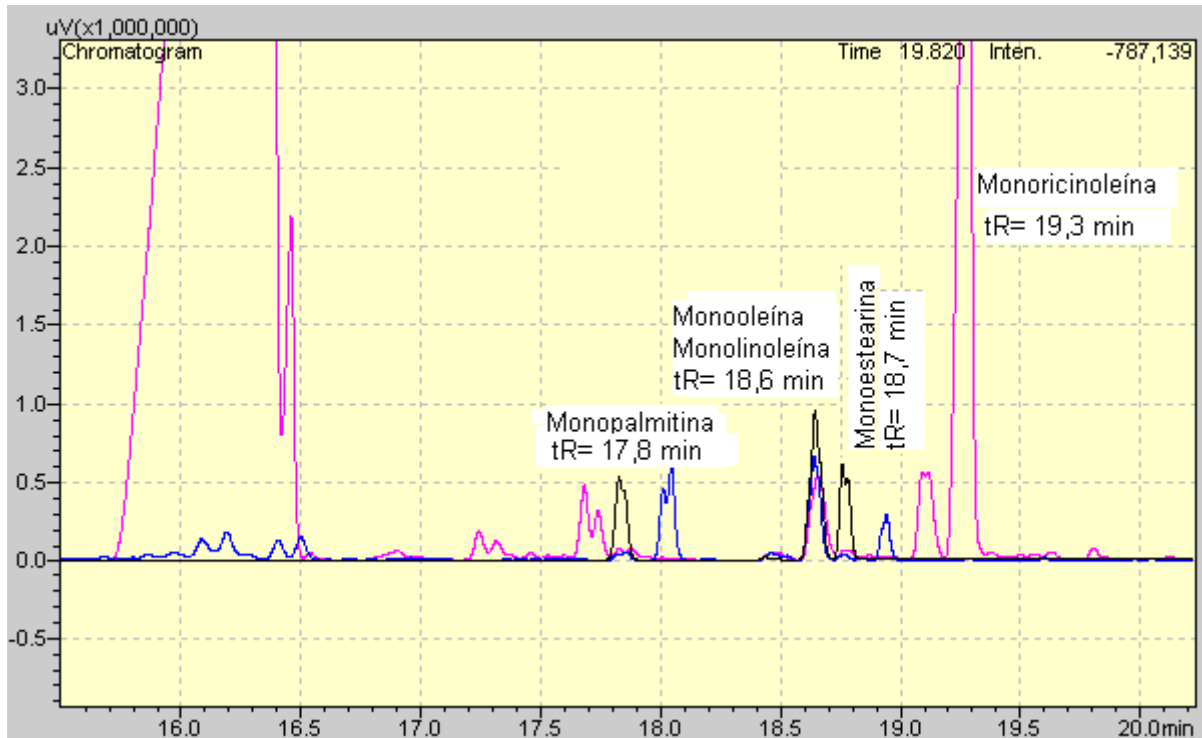


**Figura 19 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da mistura dos padrões dos monoglicerídeos em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

Para o biodiesel de mamona o principal contaminante dos monoglicerídeos é a monoricinoleína, só há disponível padrão analítico deste composto nos EUA e não há representante de venda no Brasil, portanto a compra desse produto implica em custo e tempo.

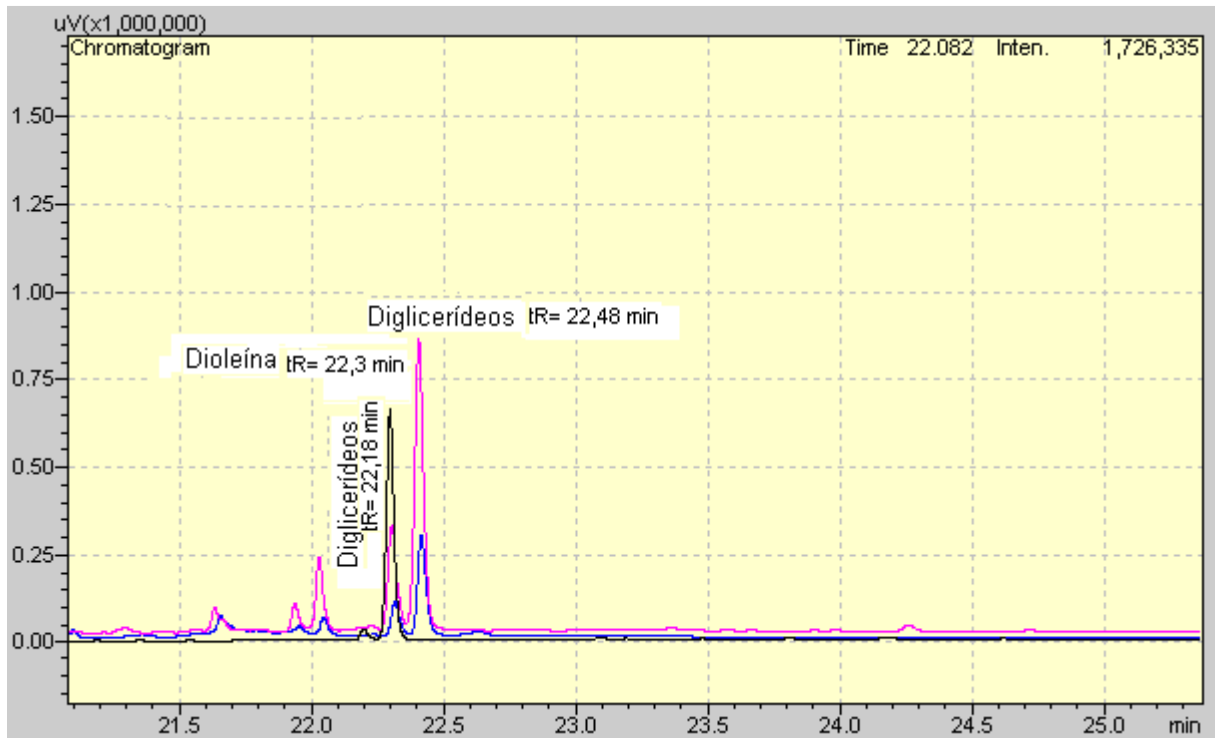
Na Figura 20, por não dispor do padrão da monoricinoleína no laboratório, foi feita a sobreposição dos cromatogramas da amostra de biodiesel etílico de girassol, da amostra de biodiesel etílico de mamona e da mistura dos monoglicerídeos. A monoricinoleína foi identificada com  $t_R = 19,3$  minutos com base em três requisitos: pico de área majoritária com relação aos outros monoglicerídeos, eluição posterior

aos demais monoglicérides e pico que não está presente no cromatograma da amostra de biodiesel etílico de girassol. Além da monoricinoleína foram identificadas monopalmitina com  $t_R = 17,8$  minutos, monooleína  $t_R = 18,6$  minutos, monolinoleína  $t_R = 18,6$  minutos e monoestearina com  $t_R = 18,7$  minutos,



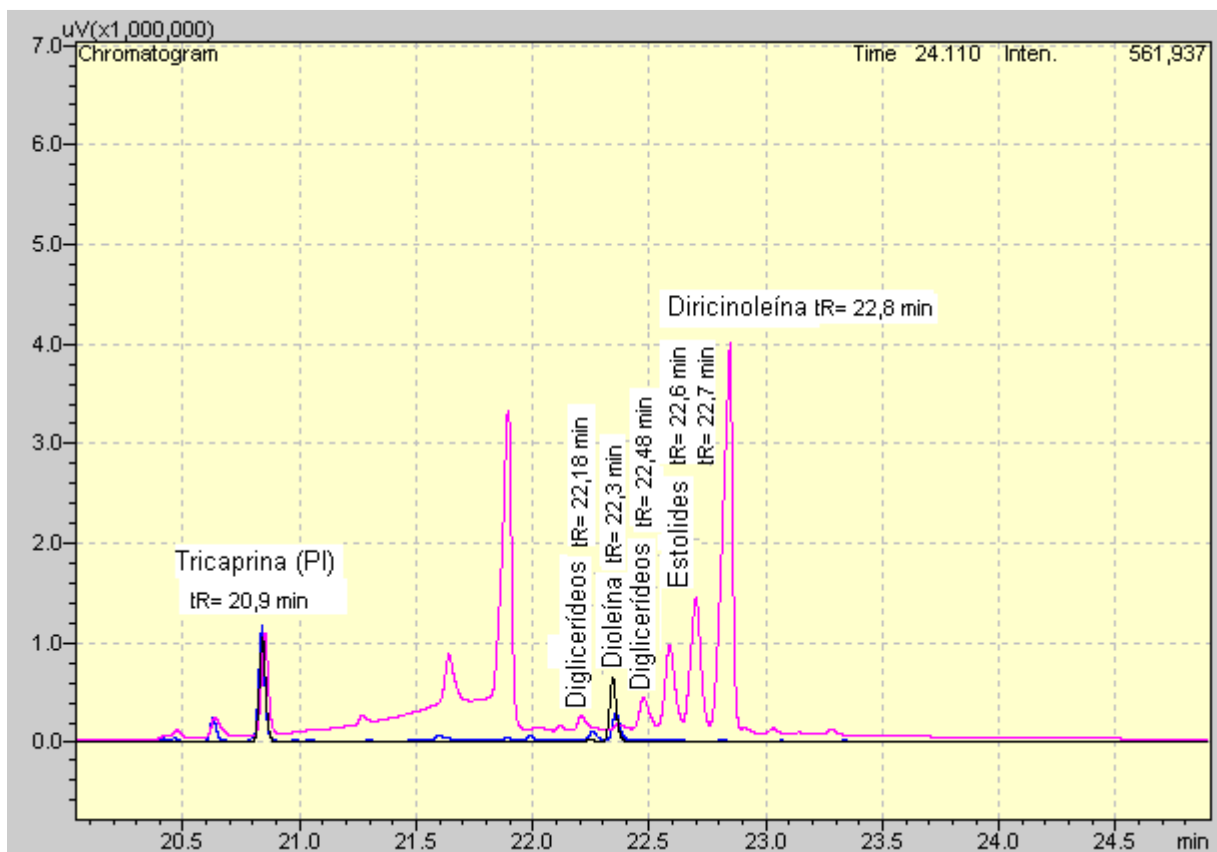
**Figura 20 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da mistura dos padrões dos monoglicérides em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico de mamona em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

Através da Figura 21, foi estabelecida para as amostras de girassol e da mistura de sebo e soja banda de tempo de retenção de 22,18 a 22,48 minutos para identificação e quantificação dos diglicérides.



**Figura 21 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da dioleína em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico da mistura de sebo:soja (20:80) em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

Para o biodiesel etílico de mamona, Figura 22, além de considerar a banda de 22,18 a 22,48 minutos para os diglicerídeos, foi identificada a diricinoleína com tempo de retenção de 22,8 minutos. Os requisitos considerados para identificação da diricinoleína foram os mesmos utilizados para a monoricinoleína, pois para esse composto não há padrão analítico disponível nem mesmo em nível de importação.



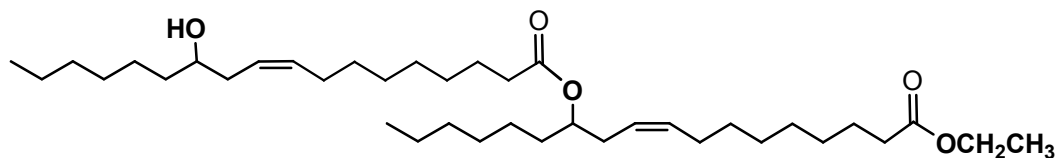
**Figura 22 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da dioleína em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico de mamona em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

Ainda para o biodiesel de mamona foram desconsiderados dois picos eluídos entre os diglicerídeos nos tempos de retenção de 22,6 e 22,7 minutos, por se tratarem provavelmente de dímeros formados no processo de produção do biodiesel. No biodiesel de mamona produzido por catálise alcalina homogênea costuma haver a formação de dímeros que eluem na mesma região dos diglicerídeos (VIEIRA *et al.*, 2008). Estudo realizado no Centro de Pesquisa da Petrobras (CENPES) demonstrou que a hidroxila do ricinoleato em presença do catalisador reage com a carboxila dos ésteres formando dímeros denominados estolides, mesmo à temperatura ambiente. A fórmula e a massa molecular do dímero do ricinoleato no caso de rota metílica são  $C_{37}H_{68}O_5$  e 592,51; respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2008).

Ao se tratar de biodiesel produzido por rota etílica é sugerido neste trabalho que o dímero, Figura 23, tenha como fórmula molecular  $C_{38}H_{70}O_5$  e como massa molecular 606,51. Além disso, a presença de dois picos com tempo de retenção de

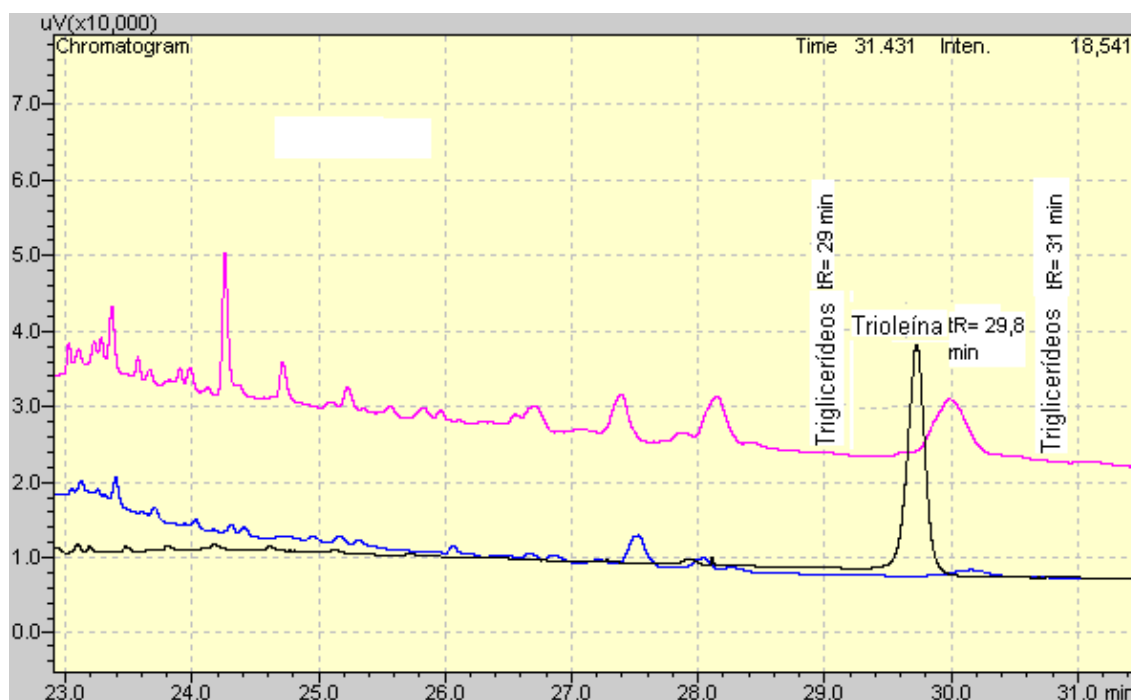


22,6 e 22,7 minutos, Figura 22, sugere a formação de dois dímeros diferentes. A partir disso é concluído a possível formação de dímeros entre os ésteres de ricinoleato e os outros ésteres presente no biodiesel de mamona.



**Figura 23 – Dímero formado por ésteres etílicos de ricinoleato**

Para os triglicerídeos, Figura 24, foi estabelecida banda de tempo de retenção de 29 a 31 minutos para amostras de biodiesel etílico de girassol e da mistura de sebo:soja (20:80).

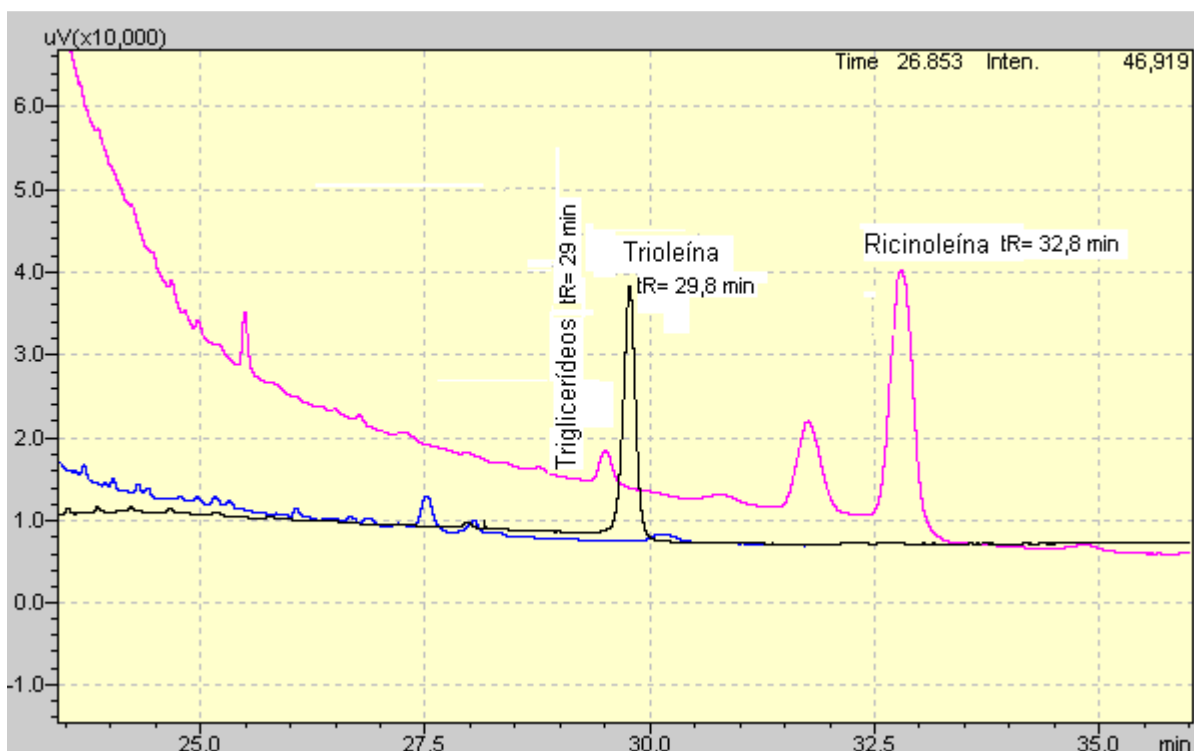


**Figura 24 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da trioleína em preto, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico da mistura de sebo e soja (20:80) em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

Para amostra de biodiesel etílico de mamona, Figura 25, a banda de tempo de retenção foi maior, 29 a 33 minutos, em virtude da presença da ricinoleína com  $t_R = 32,8$  minutos. Também não há padrão analítico para a ricinoleína nem a nível de

importação, por isso os requisitos para identificação desse composto foram os mesmos utilizados para a monoricinoleína.

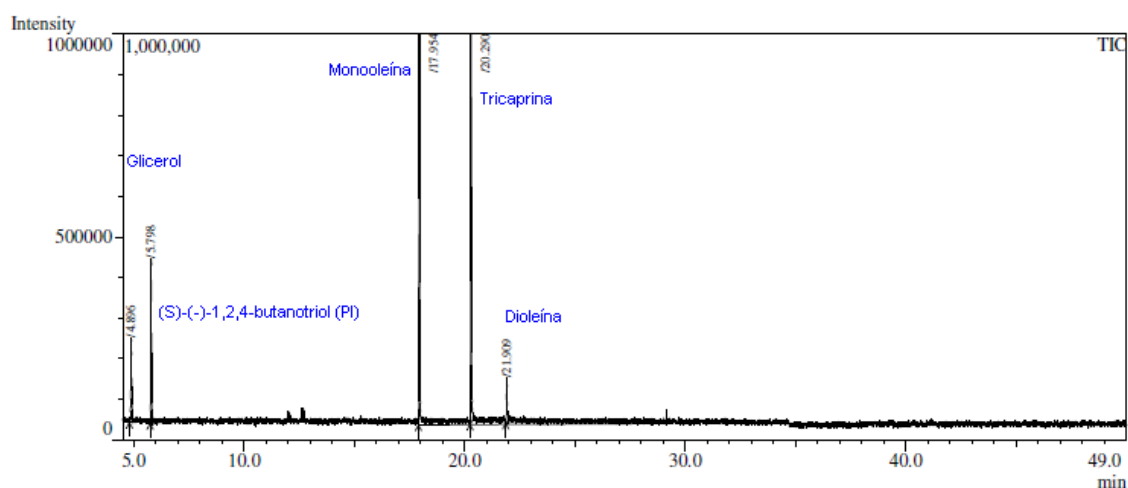
Para permitir a eluição da ricinoleína o tempo de análise foi prolongado em cinco minutos trocado de 10 para 15 minutos a permanência da temperatura de 380 °C no forno.



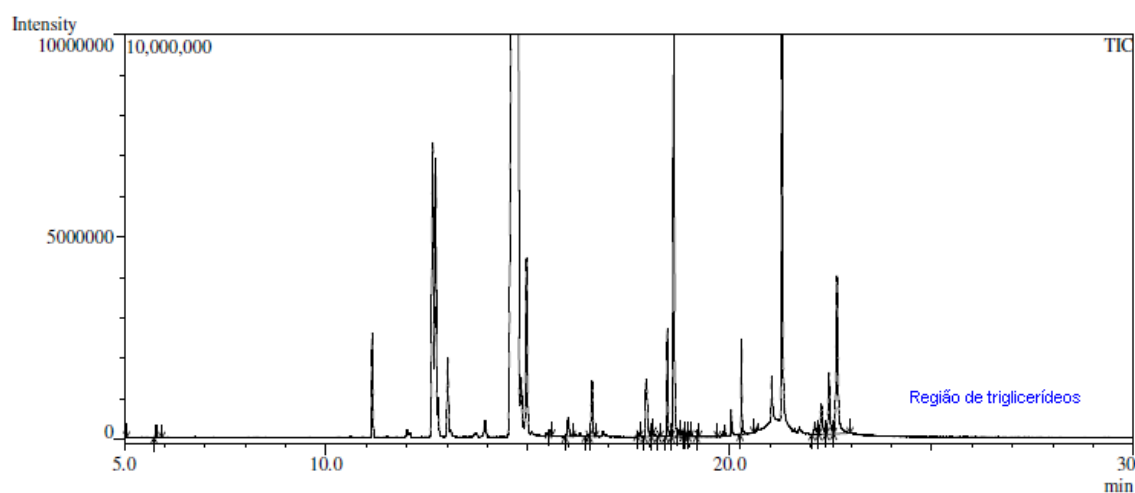
**Figura 25 - Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da trioleína, amostra de biodiesel etílico de girassol em azul e amostra de biodiesel etílico de mamona em rosa sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

#### 5.4.1 GC-MS para confirmação dos compostos

Devido à indisponibilidade dos padrões de monoricinoleína, 1,3-diricinoleína e ricinoleína foram realizados testes no GC-MS para confirmação desses compostos. Nesses ensaios não foi possível a eluição dos triglicerídeos por serem compostos pouco voláteis, sendo necessárias temperaturas mais elevadas que as permitidas na fonte de íons e na interface do GC-MS. A não eluição desses compostos pode ser percebida nas Figuras 26 e 27, cromatogramas da mistura dos padrões e da amostra, respectivamente.



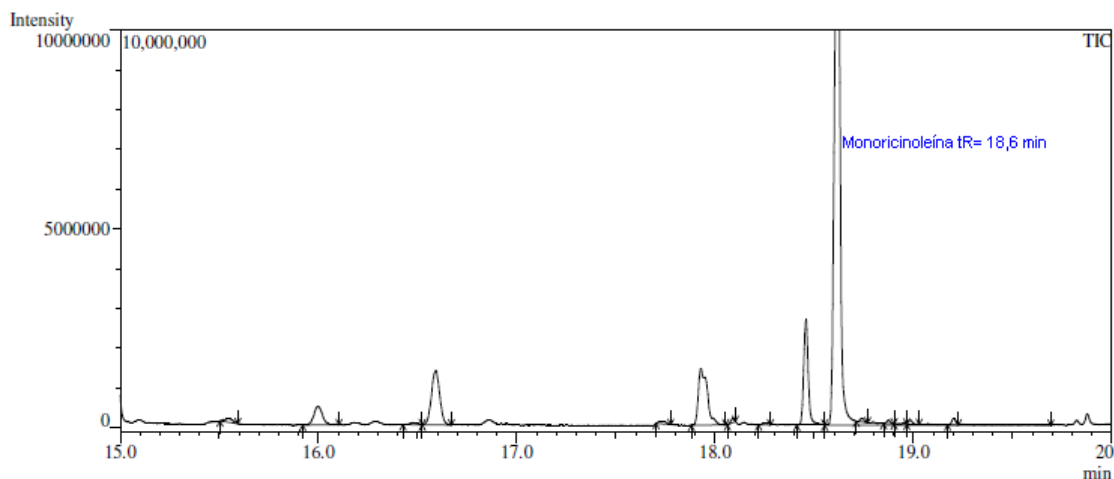
**Figura 26 – Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração dos padrões**



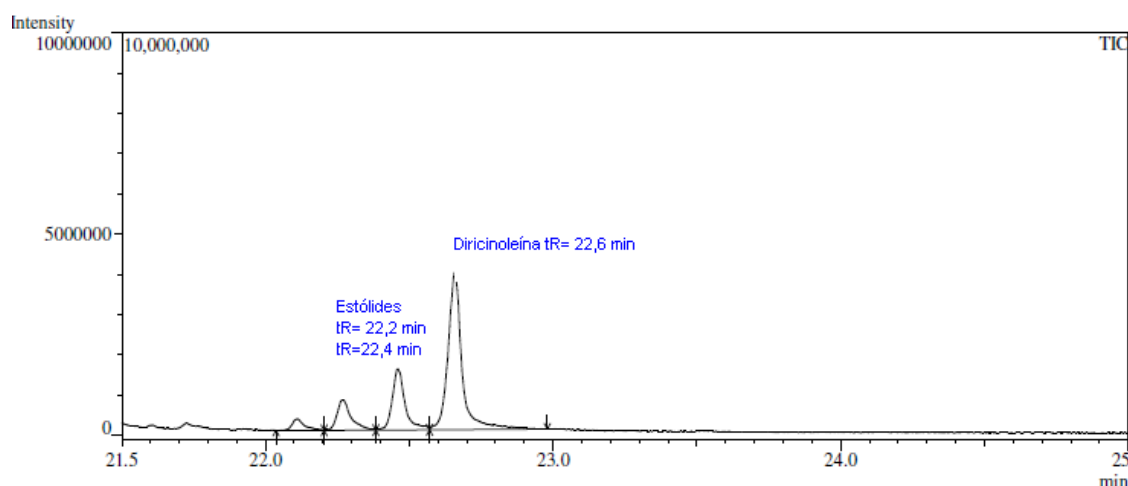
**Figura 27 – Perfil cromatográfico da amostra de biodiesel etílico de mamona derivatizada com 500 µL de MSTFA**

Nas Figuras 28 e 29 são destacadas as faixas de mono- e diglicerídeos da amostra de mamona no GC-MS e é possível perceber a semelhança com as faixas obtidas no GC-FID (item 5.4 página 69 e 71 ).

Na Figura 28 o pico com tempo de retenção de 18,6 minutos foi considerado como sendo a monoricinoleína, da mesma maneira que no cromatograma obtido no GC-FID.



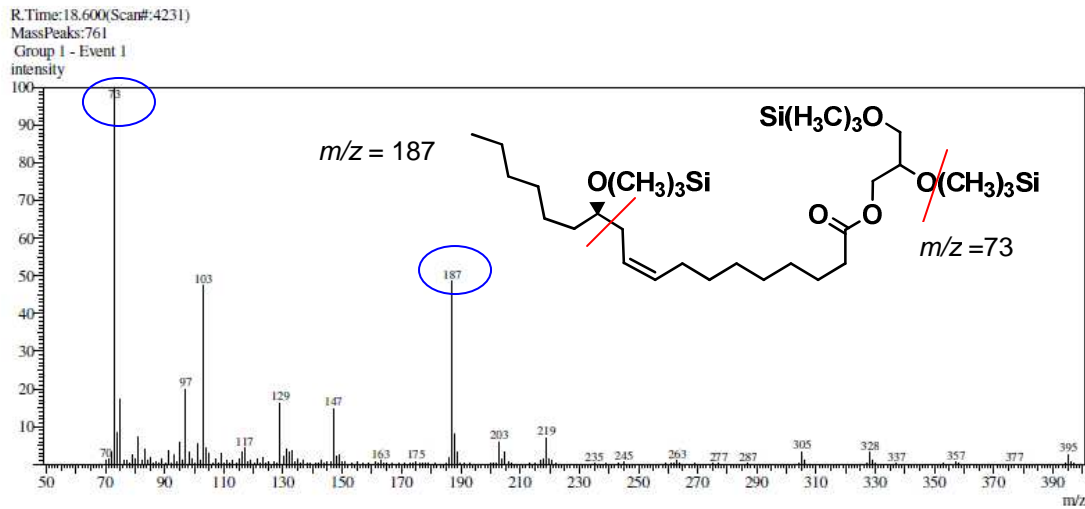
**Figura 28 – Perfil cromatográfico da região de monoglicerídeos da amostra de biodiesel etílico de mamona**



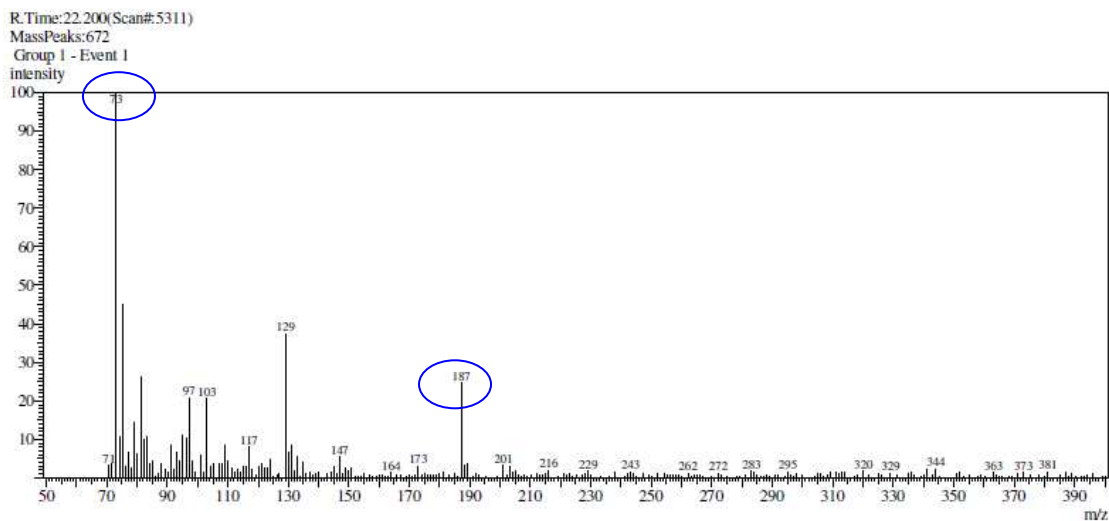
**Figura 29 – Perfil cromatográfico da região de diglicerídeos da amostra de biodiesel etílico de mamona**

Na Figura 29 os picos com tempos de retenção de 22,2 e 22,4 minutos foram considerados os estólides e em 22,6 minutos a 1,3 diricinoleína. Do mesmo modo que no cromatograma do GC-FID.

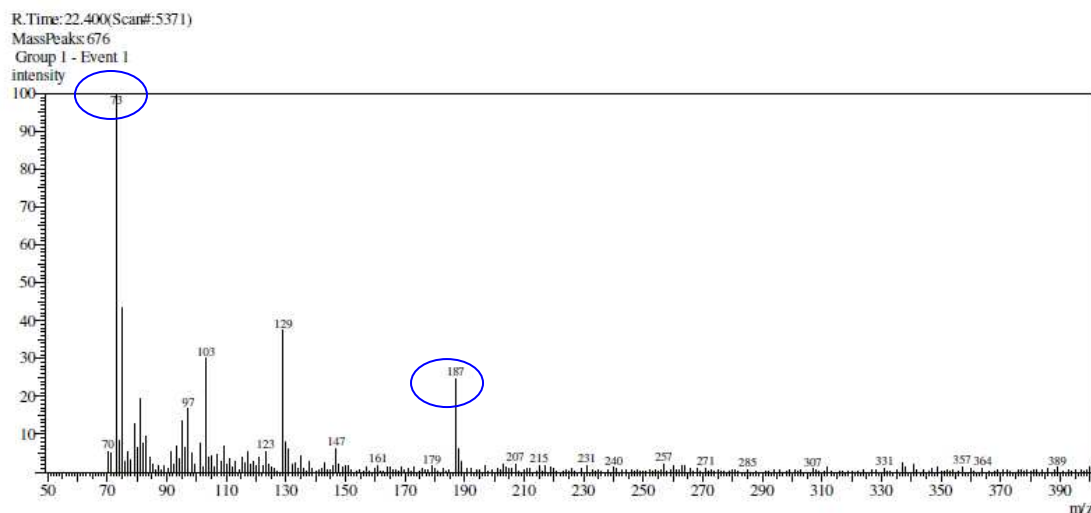
Nas Figuras de 30 a 33 são apresentados os espectros de massas desses compostos de  $m/z$  70 a 400, embora tenha sido realizada varredura de  $m/z$  70 a 1090, na faixa de  $m/z$  400 a 1090 não houve fragmentos intensos.



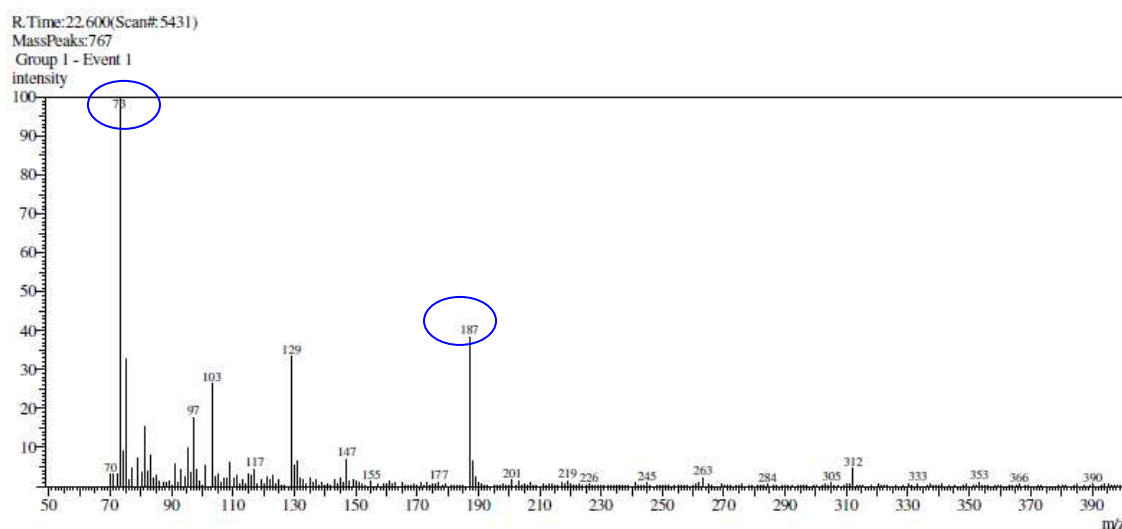
**Figura 30 – Espectro de massas m/z de 70 a 400 para monoricinoleína derivatizada com MSTFA**



**Figura 31 – Espectro de massas m/z de 70 a 400 para estólido derivatizado com MSTFA**



**Figura 32 – Espectro de massas  $m/z$  de 70 a 400 para estólido derivatizado com MSTFA**



**Figura 33 – Espectro de massas  $m/z$  de 70 a 400 para 1,3-diciclinoleína derivatizada com MSTFA**

SHIBAHARA *et al.* (2008) desenvolveram um método por GC-MS com ionização por impacto de elétrons para determinação de traços de ácido ricinoleico em óleos. Identificaram o íon mais intenso  $m/z$  73,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$ , como sendo característico de compostos trimetilsililados e o  $m/z$  187 no espectro do metil ricinoleato originário da quebra da ligação  $\alpha$  ao grupo silil éter.

Através dos espectros de massas obtidos no GC-MS foi possível confirmar que os compostos que estavam sendo considerados anteriormente como derivados do éster do ácido ricinoléico, realmente são derivados.

## 5.5 Validação do método

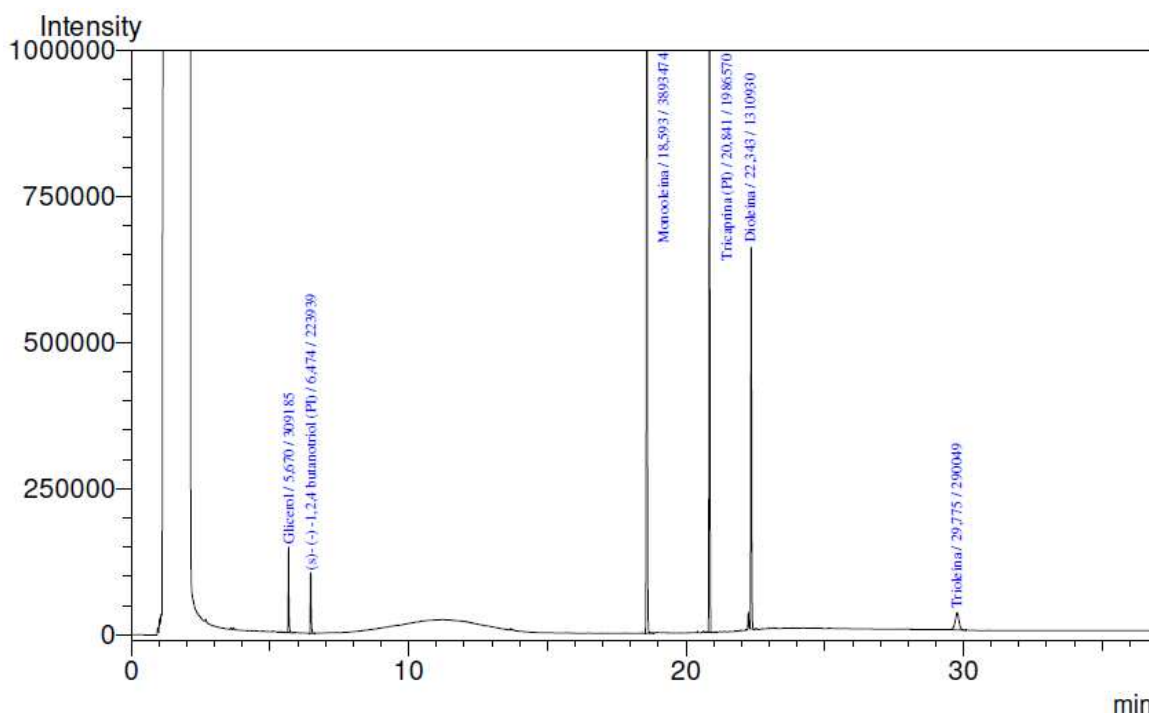
### 5.5.1 Curva analítica e linearidade

Os dados de linearidade de cada composto estão descritos na Tabela 13 e na Figura 34 é apresentado um cromatograma da mistura dos padrões.

**Tabela 13 – Resultados de linearidade e curva analítica de cada composto no método**

Composto	Faixa linear % (m/m)	Equação da reta	<i>r</i>
Glicerol	0,005 – 0,05	$y = 2,9004x - 4,710^{-2}$	0,9996
Monooleína	0,1 – 1,0	$y = 1,5778x - 2,210^{-3}$	0,9998
Dioleína	0,05 – 0,5	$y = 1,0665x - 9,910^{-4}$	0,9998
Trioleína	0,0522 – 0,5220	$y = 0,2334x - 810^{-3}$	0,9996

A ANVISA recomenda uma linearidade de 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90, como pode ser observado na Tabela 13 o método apresentou  $r > 0,999$  para todos compostos, o que representa uma boa linearidade.



**Figura 34 – Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da mistura dos padrões sob as condições de análise do método ASTM D 6584**

**Tabela 14 – Tempos de retenção ( $t_R$ ) e áreas dos compostos na Figura 34**

Composto	$t_R$ (min)	Área
Glicerol	5,6	309185
(S)-(-)-1,2,4-butanotriol (PI)	6,4	223939
Monooleína	18,6	3893474
Tricaprina (PI)	20,8	1986570
Dioléina	22,3	131930
Trioléina	29,7	290049

### 5.5.2 Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada para saber se a escolha pelo método mais rápido, ASTM D 6584, não comprometeu o sinal obtido para cada composto.

Na Tabela 15 são apresentadas a equação da reta de cada composto nos dois métodos: ASTM D 6584 e EN 14105.

**Tabela 15 – Equação da reta para cada composto nos métodos: ASTM D 6584 e EN 14105 para avaliação da sensibilidade**



Composto	Faixa linear % (m/m)	Equação da reta método ASTM D 6584	<i>r</i>	Equação da reta Método EN 14105	<i>r</i>
Glicerol	0,005 – 0,05	$y = 2,9004x - 4,710^{-2}$	0,9996	$y = 2,89x - 4,7 \cdot 10^{-2}$	0,9995
Monooleína	0,1 – 1,0	$y = 1,5778x - 2,210^{-3}$	0,9998	$y = 1,5620x - 1,65 \cdot 10^{-3}$	0,9995
Dioléina	0,05 – 0,5	$y = 1,0665x - 9,910^{-4}$	0,9998	$y = 1,0693x - 6,8 \cdot 10^{-3}$	0,9994
Trioléina	0,0552 – 0,552	$y = 0,2334x - 810^{-3}$	0,9996	$y = 0,2788x - 7,5 \cdot 10^{-3}$	0,9994

Ao comparar o coeficiente angular para cada composto dado pela equação da reta obtida em cada método foi concluído que não há diferença de sensibilidade dos métodos, pois os coeficientes angulares apresentaram semelhança.

### 5.5.3 Precisão

A precisão instrumental (Tabela 16) foi avaliada para todos os níveis de concentração, na curva analítica, para cada composto.

**Tabela 16 – Precisão instrumental (RSD<sub>i</sub>) para os compostos nos níveis de concentração da curva analítica**

Composto	1º nível % (m/m)	RSD <sub>i</sub> (%)	2º nível % (m/m)	RSD <sub>i</sub> (%)	3º nível % (m/m)	RSD <sub>i</sub> (%)	4º nível % (m/m)	RSD <sub>i</sub> (%)	5º nível % (m/m)	RSD <sub>i</sub> (%)
Glicerol	0,005	3,3	0,015	0,48	0,025	0,24	0,035	0,40	0,05	0,44
Monooléina	0,1	0,08	0,25	0,07	0,50	0,12	0,75	0,15	1	0,13
Dioléina	0,05	2,38	0,1	1,0	0,2	1,47	0,35	0,18	0,5	0,43
Trioléina	0,05	7,9	0,1	4,0	0,2	1,31	0,35	1,47	0,5	0,16

Os resultados de precisão para o método em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) estão apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19 juntamente com os de exatidão. Os valores de repetitividade ficaram entre 1,1 e 4,2% e de precisão intermediária ficaram entre 1,8 e 8,2% para glicerol, monooleína e dioleína, quando foram considerados nos cálculos pelo método de adição os padrões internos. Já quando os padrões internos não foram considerados nos cálculos pelo método de adição os valores de repetitividade e de precisão intermediária para esses compostos ficaram entre 2,3 e 4,7; 3,4 e 8,8 respectivamente. Para a trioleína os valores de repetitividade ficaram 4,7 e 10,7% e os de precisão intermediária entre 1,8 e 6,8%.

Os valores de precisão tanto para o método como para o instrumento foram aceitáveis, visto que os valores de RSD foram inferiores a 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 5.5.4 Exatidão

Em ensaio prévio realizado, foi constatado que a amostra de biodiesel etílico de mamona apresentava um teor de glicerol muito elevado. Por isso, essa amostra passou por procedimento de purificação para diminuição do teor de glicerol livre. O procedimento consistiu da extração com volume de 50 mL de acetato de etila, após a amostra foi lavada seis vezes com água destilada a 60 °C, as fases foram separadas e posteriormente a amostra foi seca com  $MgSO_4$ . Em seguida foi feita a filtração, em papel filtro e evaporação.

Nas Tabelas 17 e 18 são apresentados os valores de exatidão calculados pelo método de adição de padrão para o glicerol, monooleína e dioleína.

**Tabela 17 – Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos no biodiesel etílico de mamona em diferentes níveis considerando os padrões internos**

Composto	Nível de fortificação (% m/m)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Exatidão (%)	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)
Glicerol	0,005	67	1,4	72	6,7
	0,025	93,4	1,5	93	2,5

	0,05	97,4	1,9	108,3	1,8
	0,1	67	1,1	90,1	8,2
Monooleína	0,5	104,2	1,6	105,7	5,8
	1	96,8	2,5	108,1	3,2
	0,05	53,1	2,4	98,5	4,0
Dioleína	0,2	93,2	2,2	119,8	3,3
	0,5	95,8	2,3	106,8	2,7

**Tabela 18 – Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos no biodiesel etílico de mamona em diferentes níveis sem considerar os padrões internos.**

Composto	Nível de fortificação (% m/m)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Exatidão (%)	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)
Glicerol	0,005	80,6	3,5	82,6	7,5
	0,025	96	2,6	88,8	3,4
	0,05	101,6	4,1	119,3	5,6
Monooleína	0,1	91,9	2,3	70	8,8
	0,5	96,4	4,2	114,2	6,6
	1	94,1	4,7	101,7	6,5
Dioleína	0,05	104,9	2,6	98,5	4,3
	0,2	104,6	4,0	119,8	4,2
	0,5	107,6	4,4	106,8	5,0

Ao comparar as Tabelas 17 e 18 foi verificado que os valores de RSD (%) do método foram menores ao considerar os padrões internos. Desse modo, as adições dos padrões internos melhoraram a precisão do método. Segundo BROWN *et al.* (2009) o uso padrões internos no método de adição padrão melhora a precisão em comparação ao tradicional método de adição padrão sem padronização interna.

A trioleína é único composto, dentre os analisados, que não possui hidrogênios aptos a sofrerem reação de silição; além de não estar presente na matriz estudada. O estudo da exatidão do método para esse composto (Tabela 19) foi feito por ensaios de recuperação conforme PLANK e LORBEER (1995).

**Tabela 19 – Recuperação (%) e RSD (%) do método para a trioleína no biodiesel etílico de mamona em diferentes níveis**

Composto	Nível de fortificação (% m/m)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)
Trioleína	0,0522	100,9	10,7	115,5	6,8
	0,2088	82,5	4,7	85,6	5,7
	0,5220	76,5	5,1	80,2	1,8

Os valores de exatidão para glicerol, monooleína e dioleína variaram de 70 a 126,7% quando não foram considerados nos cálculos os padrões internos e de 53,1 a 119,8% quando foram considerados os padrões internos. Já para trioleína as recuperações variaram de 76,5 a 115,5%.

Os valores de exatidão foram satisfatórios uma vez que na análise de resíduos são aceitos valores entre 70 e 120% (SANCO, 2007). E em alguns casos dependendo da complexidade da amostra e do método empregado, essa faixa de valores pode ser ampliada ou restringida.

### 5.5.5 Robustez

O método foi robusto frente às variações da composição química da matriz, ou seja, na aplicação a biodiesel de mamona e a ésteres etílicos. Para o biodiesel de mamona uma otimização da reação de silição foi necessária.

### 5.6 Efeito matriz

A ocorrência ou não do efeito matriz no biodiesel etílico de mamona foi avaliada através das curvas analíticas dos compostos de interesse.

Na Figura 35 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o glicerol.

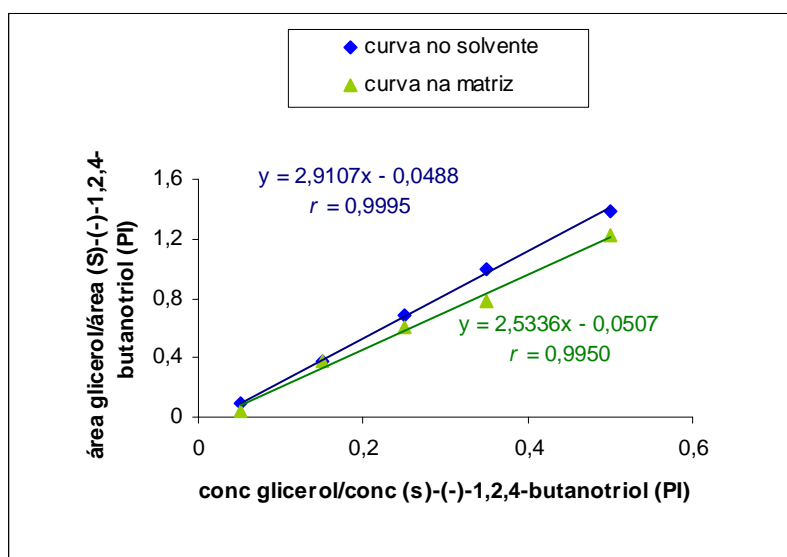
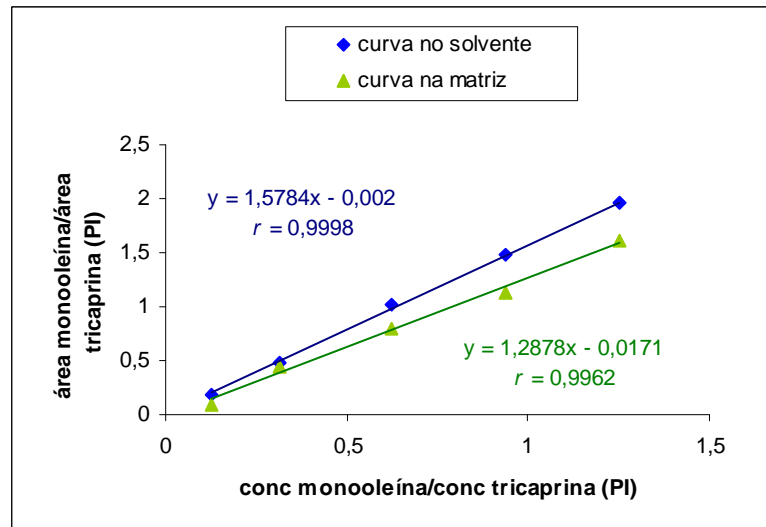


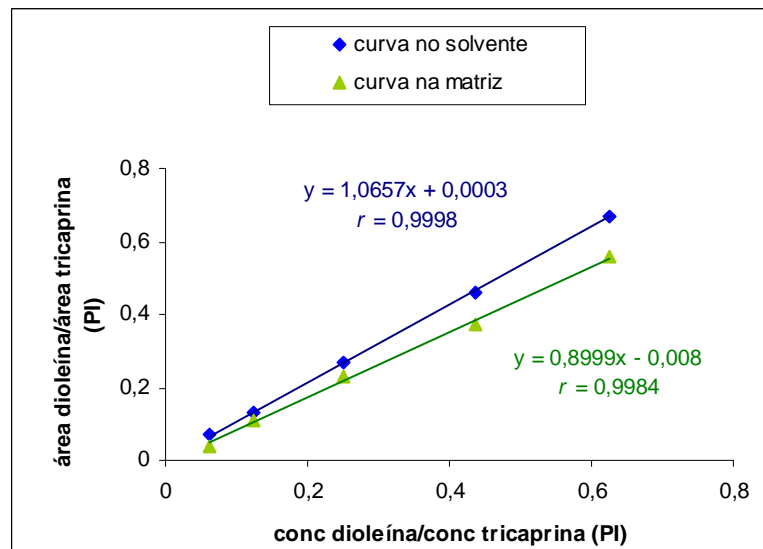
Figura 35 – Curvas analíticas do glicerol no solvente e na matriz

Na Figura 36 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para a monooleína.



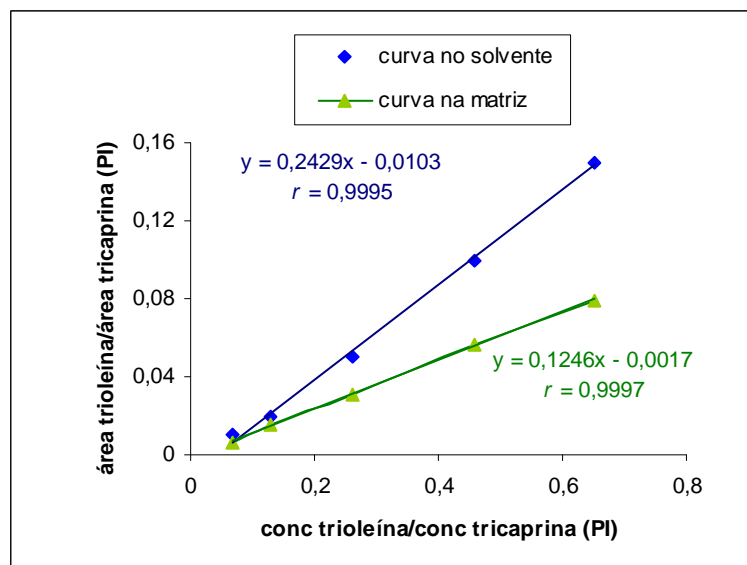
**Figura 36 – Curvas analíticas da monooleína no solvente e na matriz**

Na Figura 37 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para a dioleína.



**Figura 37 – Curvas analíticas da dioleína no solvente e na matriz**

Na Figura 38 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para a trioleína



**Figura 38 – Curvas analíticas da trioleína no solvente e na matriz**

A comparação visual entre as curvas no solvente e na matriz mostrou a ocorrência de efeito matriz para todos os compostos, sendo mais acentuado para a trioleína. Isso pode ser confirmado através dos resultados apresentados na Tabela 20. Para todos os compostos o efeito matriz deu negativo, ou seja, uma supressão do sinal, indicando para os compostos estudados um comportamento diferente do que se tem descrito na literatura, item 3.7 página 42, sobre efeito matriz em análises por GC, pois em análises por GC normalmente é observado o enriquecimento do sinal.

**Tabela 20 – Efeito matriz (%) para os compostos calculado a partir das inclinações das curvas analíticas no solvente e na matriz**

Composto	Efeito matriz (%)
Glicerol	-12,9
Monooleína	-18,4
Dioleína	-15,5
Trioleína	-48,7

Para o glicerol, monooleína e dioleína o efeito matriz é considerado baixo e para trioleína é considerado médio (ECONOMOU *et al.*, 2009).

Como o método de adição padrão é uma das formas de superar ou reduzir o efeito matriz os resultados de exatidão anteriormente apresentados (Tabelas 17 e 18) para o glicerol, a monooleína e a dioleína não precisam ser corrigidos. No entanto, para a trioleína esses resultados foram calculados novamente considerando

a curva na matriz (Tabela 21), a qual se trata de outra maneira de compensar o efeito matriz.

**Tabela 21 – Recuperação (%) do método para a trioleína calculada pelas curvas na matriz e no solvente**

Composto	Nível de fortificação (% m/m)	R <sub>r</sub> (%) Curva no solvente	R <sub>r</sub> (%) Curva na matriz	R <sub>pi</sub> (%) Curva no solvente	R <sub>pi</sub> (%) Curva na matriz
Trioleína	0,05	100,9	91	115,5	119,3
	0,2	82,5	128,2	85,6	140,5
	0,5	76,5	138,6	80,2	145,9

Embora tenha sido observado efeito matriz para todos os compostos, em análises de rotina é preferível a quantificação através de curvas analíticas no solvente em comparação a utilização de curvas analíticas na matriz ou método de adição padrão.

A ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel leva a uma variedade nas composições químicas no biodiesel gerado. E ao considerar que o efeito matriz pode variar dependendo do caráter da matriz e da razão entre o analito e a matriz, para quantificação dos analitos em questão é necessário construir curvas na matriz para cada tipo de biodiesel. Por exemplo, curva na matriz para o biodiesel etílico de mamona e outra curva na matriz para o biodiesel etílico de girassol.

O método de adição padrão também não é o mais indicado para superar ou reduzir o efeito matriz em análises de rotina, pois com esse método é necessário uma curva para cada amostra, independente se as amostras tiverem a mesma origem ou não.

### **5.7 Resumo do método utilizado para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura de sebo e soja**

❖ Soluções analíticas



As soluções estoque foram preparadas em piridina resultando nas seguintes concentrações para cada composto: 0,5 mg mL<sup>-1</sup> para glicerol, 1 mg mL<sup>-1</sup> para (S)-(-)-1,2,4-butanotriol, 8 mg mL<sup>-1</sup> para tricaprina, 5 mg mL<sup>-1</sup> para monooleína, dioleína e trioleína. A partir dessas soluções foram preparadas as soluções trabalho obtendo as faixas lineares de: 0,005 a 0,05% (m/m) para glicerol, 0,1 a 1% (m/m) para monooleína e 0,05 a 0,5% (m/m) para dioleína e trioleína. E concentrações constantes para os padrões internos de 0,1% (m/m) para (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e 0,8% (m/m) para tricaprina.

As soluções trabalho foram sililadas com 100 µL de MSTFA e tempo de reação de 20 minutos com posterior adição de 8 mL de n-heptano.

#### ❖ Preparo das amostras

Em 100 mg de amostra foram adicionados 100 µL da solução estoque de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol, 100 µL da solução estoque de tricaprina e um volume de 100 µL de MSTFA. Já as amostras de biodiesel de mamona foram sililadas com de 500 µL de MSTFA. O tempo de reação de sililação foi de 20 minutos com posterior adição de 8 mL de n-heptano.

#### ❖ Condições GC-FID

As condições utilizadas foram: coluna capilar de sílica fundida HT5 - 5% fenil polisiloxano – carborano marca SGE, com dimensões 25 m x 0,32 mm D.I., 0,1 µm de espessura do filme; volume de injeção de 1 µL; gás de arraste H<sub>2(g)</sub> com velocidade linear de 50 cm s<sup>-1</sup>; injetor *on-column* com técnica de injeção *simple on-column* e modo de injeção direct; temperatura no injetor 70 °C por 1 min, 20 °C min<sup>-1</sup> até 380 °C por 15,31 min; detector (FID) a 380 °C e com H<sub>2(g)</sub> a 40 mL min<sup>-1</sup>, ar sintético a 400 mL min<sup>-1</sup> e N<sub>2(g)</sub> como gás make up a 30 mL min<sup>-1</sup>.

#### ❖ Tempos e bandas de retenção

Na Tabela 22 são apresentados os compostos com os tempos e as bandas de retenção.

**Tabela 22 – Tempos e bandas de retenção utilizados para identificação e quantificação dos compostos**

Composto	Tempos ou bandas
----------	------------------

	de retenção
Glicerol	5,6
(S)-(-)-1,2,4-butanotriol (PI)	6,4
Monopalmitina	17,8
Monooleína e monolinoleína	18,6
Monoesteriana	18,7
*Monoricinoleína	19,2
Tricaprina (PI)	20,8
Dioleína	22,3
Diglicerídeos	22,18 a 22,48
*Diricinoleína	22,8
Trioleína	29,7
Triglicerídeos	29 a 31
*Triglicerídeos	29 a 33

\*São referentes ao biodiesel de mamona

#### ❖ Método para quantificação

As curvas analíticas obtidas foram respectivas as faixas lineares descritas anteriormente. O modo de integração inicialmente usado foi o modo linear, sendo na seqüência trocado para o modo “manual RF linear” para ser possível a quantificação dos glicerídeos.

## 6 Aplicação do método

O método foi aplicado a amostras de biodiesel etílico: de mamona, da mistura de sebo/soja (20/80%) e de girassol produzidas nos laboratórios de Química Orgânica da FURG. Na Tabela 23 são apresentados os resultados para os compostos analisados.

**Tabela 23 – Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos nas amostras analisadas**

Amostra	Glicerol livre (% m/m)	Monoglicerídeos (% m/m)	Diglicerídeos (% m/m)	Triglicerídeos (% m/m)	Glicerol total (% m/m)
Biodiesel etílico de mamona	<b>0,053</b>	<b>6,164</b>	<b>4,507</b>	<b>1,315</b>	2,458
Biodiesel etílico de sebo/soja (20/80%)	<b>0,07</b>	<b>1,641</b>	<b>1,189</b>	0,213	0,694

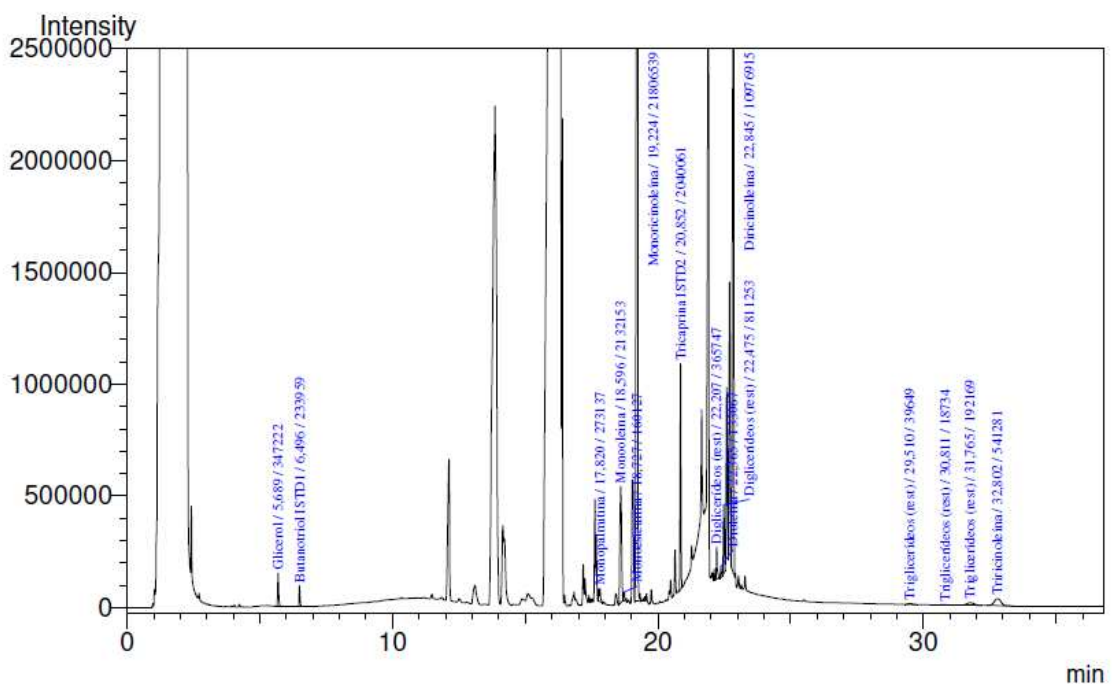
Biodiesel etílico de girassol	0,02	0,571	0,381	0,022	0,227
-------------------------------	------	-------	-------	-------	-------

Para as amostras de biodiesel etílico de mamona e da mistura de sebo/soja (20/80%) os valores de concentração (%m/m) em **negrito** mostrados na Tabela 23 são apenas uma estimativa, pois ultrapassaram o último nível de concentração da faixa linear, Tabela 10. Essas amostras também estão fora dos padrões exigidos pelas normas ANP 04/2010, ASTM D 6751 e EN 14214 (Tabela 7) em termos do conteúdo (%m/m) de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos.

Conforme os limites máximos de resíduos permitidos (Tabela 7) o biodiesel etílico de girassol é a única amostra que se encontra dentro dos padrões exigidos pelas normas ANP 04/2010, ASTM D 6751 e EN 14214 em termos de (%m/m) de glicerol livre e total.

Dentre as normas a EN 14214 é a única que estabelece limites máximos de resíduos para mono-, di- e triglicerídeos. Com base nela o biodiesel etílico de girassol apresentou concentrações de mono- e triglicerídeos inferiores aos limites máximos de resíduos; no entanto no que se refere ao conteúdo de diglicerídeos o limite máximo de resíduo foi ultrapassado

Na Figura 39 é apresentado cromatograma das amostras analisadas.



**Figura 39 – Perfil cromatográfico da amostra de biodiesel etílico de mamona analisada**

**Tabela 24 – Tempos de retenção ( $t_R$ ) e as áreas para os compostos na Figura 32**

Composto	$t_R$ (min)	Área
Glicerol	5,6	347222
(S)-(-)-1,2,4-butanotriol (PI)	6,4	233959
Monopalmitina	17,8	273137
Monooleína e monolinoleína	18,5	2132153
Monoesteriana	18,7	160127
Monoricinoleína	19,2	21806539
Tricaprina (PI)	20,8	2040061
Diglicerídeos	22,2	365745
Dioleína	22,3	133067
Diglicerídeos	22,4	811253
Diricinoleína	22,8	10976915
Triglicerídeos	29,5	39649
Triglicerídeos	30,8	18734
Triglicerídeos	31,7	192169
Ricinoleína	32,8	541281

## 7 CONCLUSÕES

A maior contribuição científica deste trabalho consiste no fato de utilizar um único método para análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de mamona. Sendo que, para tal determinação, a resolução brasileira estabelece a utilização de três diferentes métodos. Além disso, amplia a gama de amostras para as quais os métodos ASTM D 6584 e EN 14105 incluindo biodiesel de mamona e biodiesel obtido via rota etílica de girassol, mamona e da mistura de sebo e soja.

A reação de siliilação para o biodiesel etílico de mamona se mostrou eficiente ao utilizar um volume de MSTFA de 500  $\mu$ L.

Ensaio com as amostras para testar a influência de uma programação de temperatura mais branda (EN 14105) na separação de ésteres, mono-, di- e triglicerídeos em comparação ao perfil cromatográfico dessas mesmas amostras no método ASTM D 6584, mostraram que as amostras apresentam um mesmo perfil para ambos os métodos. Em vista disso, foram escolhidas as condições cromatográficas do método ASTM D 6584 por permitir análises em menor tempo em comparação ao método EN 14105.

O preparo das soluções, das curvas analíticas e das amostras também foi baseado no método ASTM D 6584, principalmente por esse avaliar a linearidade em cinco níveis de concentração, ao passo que o método EN 14105 avalia em quatro níveis de concentração, visto que, é recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes.

Foram obtidos resultados satisfatórios para todos os parâmetros de validação avaliados. As curvas analíticas apresentaram boa linearidade com  $r$  maiores que 0,999. A sensibilidade dos métodos ASTM D 6584 e EN 14105 para todos os compostos foram semelhantes, mostrando mais uma vez a indiferença em termos analíticos por optar pelas condições cromatográficas de um ou do outro método. A

exatidão e precisão do método foram avaliadas somente para a amostra de biodiesel etílico de mamona, em virtude da otimização da reação de silição. Os valores de exatidão do método ficaram entre 67 e 145,9%, com valores de precisão menores que 10,7%. O método se mostrou robusto frente a variação da composição química das amostras.

O efeito matriz para o glicerol, monooleína e dioleína foi considerado baixo e para trioleína foi considerado médio. Ainda assim é preferível a opção pela quantificação a partir das curvas analíticas no solvente.

Durante a aplicação do método, o mesmo se mostrou adequado para amostras de biodiesel etílico de mamona, de girassol e da mistura de sebo e soja (20/80%). A partir disso se obteve um perfil não representativo, pois a amostragem foi feita de forma aleatória, quanto à presença de contaminantes, das amostras que são produzidas nos laboratórios de Química Orgânica da FURG.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Monitorar o teor de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos das amostras de biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura de sebo e soja produzidas nos laboratórios de Química Orgânica da FURG;
- ❖ Quando houver disponibilidade de padrões analíticos para monoricinoleína, 1,3 diricinoleína e ricinoleína fazer corridas cromatográficas para confirmação dos mesmos;
- ❖ Desenvolver método por LC-MS/MS e comparar com o método apresentado neste trabalho;

## **9 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Os resíduos gerados das análises foram separados em frascos, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição.



## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, 2009. Disponível em: < [www.anp.gov.br/biocombustiveis/biocombustiveis.asp](http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biocombustiveis.asp) >. Acesso em: 23 set. 2009.

ANP. Resolução – RE nº 7, de 19 de março de 2008. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Disponível em: < [www.udop.com.br/download/legislacao/biodiesel/.../res\\_anp\\_7.pdf](http://www.udop.com.br/download/legislacao/biodiesel/.../res_anp_7.pdf) >. Acesso em: 30 de nov. 2009.

ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br/e-legis/](http://www.anvisa.gov.br/e-legis/) >. Acesso em: 30 de nov. 2009.

ARZAMENDI, G. *et al.* Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography. **Chemical Engineering Journal**, v. 122, p. 31 - 40, 2006.

BALAT, M., BALAT H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2727–2741, 2008.

BONDIOLI, P. *et al.* Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical aspects. Note 2: Determination of free glycerol. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 7, p. 7-9, 1992.

BONDIOLI, P., DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 153-157, 2005.

BROWN, R. J. C. *et al.* Stripping voltammetry using sequential standard addition calibration with the analytes themselves acting as internal standards. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 1-5, 2009.

CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea**. 2009. 145p. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande, RS.

CAMPOS LEITE *et al.* Indicações para o cultivo de girassol nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Roraima. **Comunicado Técnico 78: Embrapa, Londrina (PR)**, 2007. Disponível em: < [www.cnpso.embrapa.br/download/.../comtec78\\_girassol.pdf](http://www.cnpso.embrapa.br/download/.../comtec78_girassol.pdf) >. Acesso em: 14 dez. 2009.

CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 98, p.183–190, 2007.

CANOIRA, L. *et al.* Fatty acid methyl esters (FAMES) from castor oil: Production process assessment and synergistic effects in its properties. **Renewable Energy**, v. 35, p. 208-217, 2010.

CASAS, *et al.* Optimization of the reaction parameters for fast pseudo single-phase transesterification of sunflower oil. **Fuel**, v. 89, p. 650–658, 2010.

CATHARINO, R. R. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3698 – 3701, 2007.

CHEMICAL BOOK. Disponível em: < [www.chemicalbook.com/ProductIndex\\_EN.aspx](http://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx) > . Acesso em: 08 out. 2009.

CHONG, N.S. *et al.* Analysis of Monoglycerides and Diglycerides in Biodiesel Fuel by GC-MS and FTIR. **233rd ACS National Meeting, paper CELL-080, Chicago**, March 25–29, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

DA CUNHA, M. E. **Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de frango e óleo de soja**. 2008. 86p. Dissertação (Mestrado em Química) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

DEMIRBAS A. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. **Energy Conv Mgmt**, v. 47, p. 2271 – 2282, 2006.

DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review **Applied Energy**, v. 86, p. S108–S117, 2009.

DYER, J.; MULLEN R.T. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 11 – 22, 2008.

ECONOMOU, A. *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856 – 5867, 2009.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2009. Disponível em: < <http://www.cnpso.embrapa.br> > . Acesso em: 14 dez. 2009.

FERREIRA, A. G. *et al.* Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v. 77 p. 593 - 605, 2008.

FIGUEIREDO, G. R. G. *et al.* Produção de Mudanças de Girassol Ornamental (*Helianthus annuus* L. cv. Dobrado Sungold) em Diferentes Substratos. **Revista Educação Agrícola Superior**, v. 23, p. 105 - 107, 2008.

FLOGIA, T. A. *et al.* Comparison of Chromatographic Methods for the Determination of Bound Glycerol in Biodiesel, v. 60, p. 305 – 311, 2004.

FUKUDA, H. *et al.* Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405 - 416, 2001.

GELBARD, G. *et al.* <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, p. 1239 – 1241, 1995.

GONÇALVES FILHO, L.C., MICKE, G. A. Development and validation of a fast

method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p.477 – 480, 2007.

GONZÁLEZ, F. J. E., et al. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p.155 – 165, 2007.

GONZÁLEZ, R. R., et al. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 211 – 225, 2008.

HÁJEK, M. et al. Determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 666 – 669, 2006.

HAERTEL, P. L. **Desenvolvimento de um novo processo para a produção de biodiesel ético de mamona**. 2009. 106p. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande, RS

HAJSLOVÁ, J., ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181 – 197, 2003.

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

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008. 868 p.

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

IMAHARA, H. et al. Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. **Fuel**, v. 85, p. 1666–1670, 2006.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**, Brasília, 2003. 35 p. Disponível em: <[http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao\\_inmetro.pdf](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf)>. Acesso: 30 nov. 2009.

JALONEN, J. Effect of sample matrix on the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by gas chromatography–flame ionization detection.

**Microchemical Journal**, v. 8, p. 113 – 118, 2007.

KNOTHE, G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 489 – 493, 2000.

KNOTHE, G. Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 795 – 800, 1999.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993, 240 p.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

- LEBEDEVAS, S., VAICEKAUSKAS A. Use of Waste Fats of Animal and Vegetable Origin for the Production of Biodiesel Fuel: Quality, Motor Properties, and Emissions of Harmful Components. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 2274 – 2280, 2006.
- LOBO, I.P., FERREIRA, S.L.C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos Revisão. **Química Nova**, v. 32, p. 1596 – 1608, 2009.
- MA, F., HANNA, M.A.H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.
- MACEDO BELTRÃO, N. E., OLIVEIRA, M. I. P. Oleaginosas e seus Óleos: Vantagens e Desvantagens para Produção de Biodiesel. Documentos 201: **Embrapa, Campina Grande (PB)**, 2008 Disponível em: < [www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CNPA.../22146](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/CNPA.../22146) >. Acesso em: 15 dez. 2009.
- MATA, T.M. *et al.* Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217 - 232, 2009.
- MARIANI, C. *et al.* Vegetable oil derivatives as diesel fuel. Analytical aspects. Note 1: Determination of methyl esters, mono-, di- and triglycerides. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 68, p. 549-551, 1991.
- MDIC. O futuro da indústria: Biodiesel. **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**, dezembro 2006. Disponível em: <[www.mme.gov.br/programas/biodiesel/galerias/arquivos/biodiesel/ofuuturodaindustria - Biodiesel.pdf](http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/galerias/arquivos/biodiesel/ofuuturodaindustria - Biodiesel.pdf)>. Acesso em: 25 de set. 2009.
- MENDHAM, J. *et al.* **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.
- MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel, **Bioresource Technology**, v. 56, p. 7 -11, 1996.
- MITTELBACH, M. *et al.* Diesel fuel derived from vegetable oils, I: preparation and use of rapeseed-oil methyl esters. **Energy in Agriculture**, v. 2, p. 369 – 384, 1983.
- MME. Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis. **Ministério de Minas e Energia**, dezembro 2008. Disponível em: <[www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/noticias/2009/01\\_janeiro/boletim.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/noticias/2009/01_janeiro/boletim.pdf)>. Acesso em: 25 de set. 2009.
- NCBI. PubChem Compound. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound&term](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound&term)>. Acesso em: 08 out. 2009.
- NREL. Biodiesel Analytical Methods. **National Renewable Energy Laboratory**, julho 2004. Disponível em: <[www.nrel.gov/docs/fy04osti/36244.pdf](http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/36244.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2009.
- NREL. Biodiesel Handling and Use Guide. **National Renewable Energy Laboratory**, janeiro 2009. Disponível em: <[www.nrel.gov/vehiclesandfuels/pdfs/43672.pdf](http://www.nrel.gov/vehiclesandfuels/pdfs/43672.pdf)>. Acesso em: 23 set. 2009.
- ONER, C., ALTUN S. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. **Applied Energy**, v. 86, p. 2114 – 2120, 2009.
- OGUNNIYI D.S. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1086 – 1091, 2006.

PETROBRAS. Biocombustíveis o que você precisa saber sobre esse novo mercado. **Petróleo Brasileiro S/A**, julho 2008. Disponível em: <[www2.petrobras.com.br/petrobras/portugues/pdf/Cartilha\\_Biocombustiveis\\_PORTUGUES.pdf](http://www2.petrobras.com.br/petrobras/portugues/pdf/Cartilha_Biocombustiveis_PORTUGUES.pdf)>. Acesso em: 23 set. 2009.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987 - 995, 2009.

PLANK, C., LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 461 – 468, 1995.

RAMADHAS, A.S. *et al.* Use of vegetable oils as I.C. engine fuels—A review. **Renewable Energy**, v. 29, p. 727–742, 2004.

RASHID, U. *et al.* Production of sunflower oil methyl esters by optimized alkali-catalyzed methanolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1202–1205, 2008.

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

RUPPEL, T., HALL, G. Free and Total Glycerin in B 100 Biodiesel by Gas Chromatography. **Perkin Elmer Life and Analytical Sciences**, 2004. Disponível em: <[www.perkinelmer.com.br/downloads/biodiesel/far\\_b100biodieselanalysisbygc.pdf](http://www.perkinelmer.com.br/downloads/biodiesel/far_b100biodieselanalysisbygc.pdf)>.

Acesso em: 06 out. 2009.

SAKA, S., KUSDIANA, D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. **Fuel**, v. 80, p. 225 – 231, 2001.

SALA, M., BONDIOLI, P. Caratterizzazione analitica del glicerolo. Considerazioni sperimentali. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 75, p. 305 – 309, 1998.

SANCO. Document n° SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. **COMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES** (2003), 3ª ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SANTORI, G. *et al.* Quantitation of Compounds in Biodiesel Mixtures with Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 3783-3789, 2009.

SARTORI, M. A. *et al.* Análise de arranjos para extração de óleos vegetais e suprimento de usina de biodiesel. **RESR**, Piracicaba, SP, vol. 47, nº 02, p. 419-434, abr/jun 2009 – Impressa em julho 2009.

SEBRAE. Biodiesel. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**, 2007. Disponível em: <[www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha\\_Sebrae.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf)>.

Acesso em 25 de set. 2009.

SHARMA, Y. C. *et al.* Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, v. 87, p. 2355–2373, 2008.

SHENCK, F. J., LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51 – 61, 2000.

SHIBATA, M. *et al.* Genetic relationship between lipid content and linolenic acid concentration in soybean seeds. **Breeding Science**, v. 58, p. 361 – 366, 2008.

SHOTIPRUK, A. *et al.* Esterification of palm fatty acid distillate (PFAD) in supercritical

- methanol: Effect of hydrolysis on reaction reactivity. **Fuel**, v. 88, p. 2011-2016, 2009.
- SCHUMMER, C. *et al.* Analysis of *t*-Butyldimethylsilyl Derivatives of Chlorophenols in the Atmosphere of Urban and Rural Areas in East of France. **Chromatographia**, v. 63, p. 189 – 195, 2006.
- SHIBAHARA, A. *et al.* Ricinoleic Acid in Common Vegetable Oils and Oil Seeds. **Lipids**, v. 43, p. 457 – 460, 2008.
- SIATIS, N.G. *et al.* Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: Monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 53 – 57, 2006.
- SIGMA-ALDRICH BRASIL. Disponível em: <[www.sigmaaldrich.com/brazil.html](http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html)>. Acesso em: 08 de out. 2009.
- SKOOG, D.A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 999 p.
- SPOLAORE, P. *et al.* Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87 – 96, 2006.
- SRIVASTAVA, A., PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 111-133, 2000.
- TAN, M. E., VAN GERPEN, J.H. The kinematic viscosity of biodiesel and its blends with diesel fuel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 1511 – 1513, 1999.
- TESSER, R. *et al.* Kinetics of free fatty acids esterification: Batch and loop reactor modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 154, p. 25 - 33, 2009.
- VICENTE, G. *et al.* Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 297 – 305, 2004.
- VKÉY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227 – 236, 2001.
- VIEIRA, J. A. V. *et al.* Oligomerização do biodiesel de mamona durante o processo produtivo. **III Congresso Brasileiro de Mamona Energia e RicinoQuímica 2008**. Disponível em: <[www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/BIODIESEL/BD%2006.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/BIODIESEL/BD%2006.pdf)>. Acesso em: 24 fev. 2010.
- WYATT, V. T. *et al.* Fuel Properties and Nitrogen Oxide Emission Levels of Biodiesel Produced from Animal Fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 585 – 591, 2005.
- ZHANG, Y. *et al.* Rapid transesterification of soybean oil with phase transfer catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 366, p. 176 – 183, 2009.

## 11 PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

DIAS, A. N., KURZ, M. H. S., D'OCA, M. G. M., PRIMEL, E. G. **Desenvolvimento e Validação de Metodologias Empregando GC-FID para Determinação de Glicerina (livre e total) e Alcóois em Biodiesel de Mamona.** In: X Encontro de Pós Graduação – FURG, 2008.

DIAS, A. N., KURZ, M.H.S., CERQUEIRA, M. B. R., D'OCA, M. G. M., PRIMEL, E.G. **OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE MONO, DI E TRIGLICERÍDEOS EM BODIESEL DE MAMONA POR GC-FID.** In: XVI Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade, Universidade Regional de Blumenau e SBQ - Secretarias Regionais do RS, SC e PR, 2008.

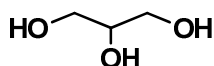
DIAS, A. N., KURZ, M. H. S., CERQUEIRA, M. B. R., MONTES D'OCA, M. G., PRIMEL, E. G. **APLICAÇÃO DO MÉTODO ASTM D 6584 EM BODIESEL METÍLICO E ETÍLICO ORIUNDO E DIFERENTES FONTES.** In: XVII Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade, Universidade Federal do Rio Grande e SBQ - Secretarias Regionais do RS, SC e PR, 2009.

DIAS, A. N., KURZ, M. H. S., CARDOSO, L. V., MONTES D'OCA, M. G., PRIMEL, E. G. **APLICAÇÃO DO MÉTODO ASTM D 6584 EM BODIESEL ETÍLICO DE MAMONA, GIRASSOL E MISTURA DE SEBO/SOJA.** In: SBQ Nacional – 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2010.

## ANEXO A - Estruturas e informações químicas para glicerol livre, mono-, di-triglicerídeos, padrões internos (S) - (-) -1,2,4- butanotriol e tricaprina e do agente derivatizante MSTFA

As informações químicas dos compostos abaixo foram obtidas nos sites da Sigma-Aldrich Brasil, do banco de dados dos Estados Unidos da América -National Center for Biotechnology Information (NCBI) e do Chemical Book.

### ❖ Glicerol



Função orgânica: álcool

Nome químico (IUPAC): 1, 2, 3 propanotriol

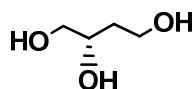
Sinônimo: glicerina

Fórmula molecular: C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 56-81-5

Massa molar: 92,09 g mol<sup>-1</sup>

### ❖ (S) - (-) -1,2,4- butanotriol



Função orgânica: álcool

Nome químico (IUPAC): (2S)-butano-1,2,4-triol

Sinônimo: não encontrado

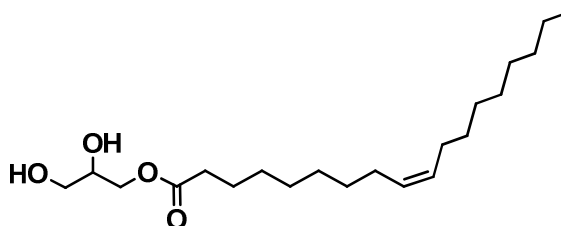
Fórmula molecular: C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS):42890-76-6

Massa molar: 106,12 g mol<sup>-1</sup>



## ❖ 1-Monooleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidróxiopropil (Z)-octadec-9-enoato

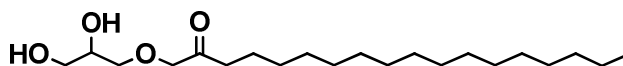
Sinônimos: 1-mono[cis-octadecenoil]-rac-glicerol, rac-glicerol 1 -monooleato, DL- $\alpha$ -monooleína

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{40}O_4$

Número no CAS: 111-03-5

Massa molar:  $356,54 \text{ g mol}^{-1}$

## ❖ 1-Monoestearina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidróxiopropil octadecanoato

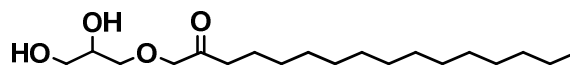
Sinônimos: 1-monooctadecanoil-rac-glicerol, rac-glicerol 1-estearato, DL- $\alpha$ -estearina

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{42}O_4$

Número no CAS: 123-94-4

Massa molar:  $358,56 \text{ g mol}^{-1}$

## ❖ 1-Monopalmitina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidróxiopropil hexadecanoato

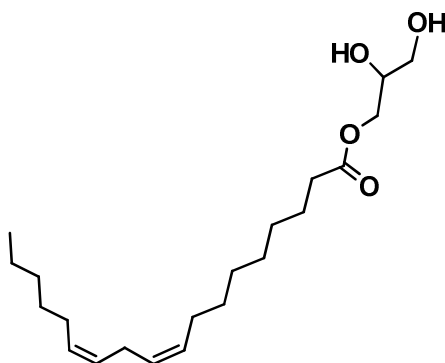
Sinônimos: 1-monohexadecanoil-rac-glicerol,  $\alpha$ -monopalmitina, rac-1-palmitoilglicerol

Fórmula molecular:  $C_{19}H_{38}O_4$

Número no CAS: 542-44-9

Massa molar: 330, 50  $g\ mol^{-1}$

❖ 1-Monolinoleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidróxipropil (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienoato

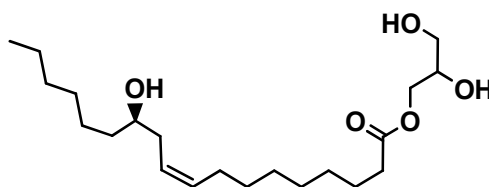
Sinônimos: 1-mono [(cis, cis) -9,12-octadecadienoil]-rac-glicerol, 1-linoleoil-rac-glicerol, 1-monolinoleoil-rac-glicerol

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{38}O_4$

Número no CAS: 2277-28-3

Massa molar: 354, 52  $g\ mol^{-1}$

❖ 1-Monoricinoleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidróxipropil 12-hidroxi-octadec-9-enoato

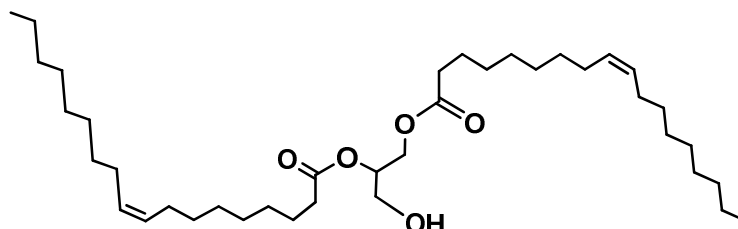
Sinônimos: glicerol ricinoleato, 12-hidróxi-9-octadecenóico

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{40}O_5$

Número no CAS: 1323-38-2

Massa molar: 372,54 g mol<sup>-1</sup>

❖ 1,3-Dioleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): [2-hidróxi-3-[(Z)-octadec-9-enoil óxipropil]] (Z)-octadec-9-enoato

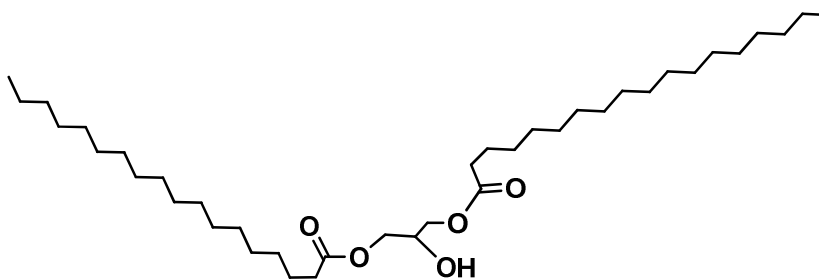
Sinônimos: 1,3-di(cis-9-octadecenoil) glicerol, 1,3-di-([cis]-9-octadecenoil)-rac-glicerol

Fórmula molecular: C<sub>39</sub>H<sub>72</sub>O<sub>5</sub>

Número no CAS: 2465-32-9

Massa molar: 620,99 g mol<sup>-1</sup>

❖ 1,3-Diestearina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): (2-hidróxi-3-octadecanoilóxipropil) octadecanoato

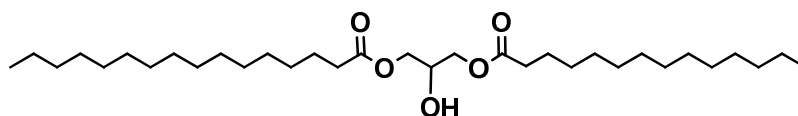
Sinônimos: 1,3-dioctadecanoilglicerol, 1,3-distearoilglicerol, gliceril 1,3-diestearato

Fórmula molecular: C<sub>39</sub>H<sub>76</sub>O<sub>5</sub>

Número no CAS: 504-40-5

Massa molar: 625,02 g mol<sup>-1</sup>

## ❖ 1,3-Dipalmitina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): (3-hexadecanoilóxi-2-hidróxipropil) hexadecanoato

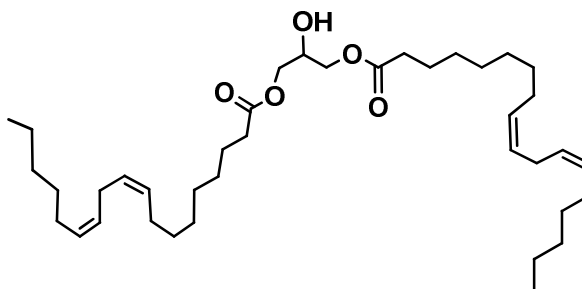
Sinônimos: 1,3-dipalmitoil-glicerol, 1,3-dihexadecanoilglicerol

Fórmula molecular:  $C_{35}H_{68}O_5$

Número no CAS: 502-52-3

Massa molar:  $568,91 \text{ g mol}^{-1}$

## 1,3-Dilinoleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): não encontrado

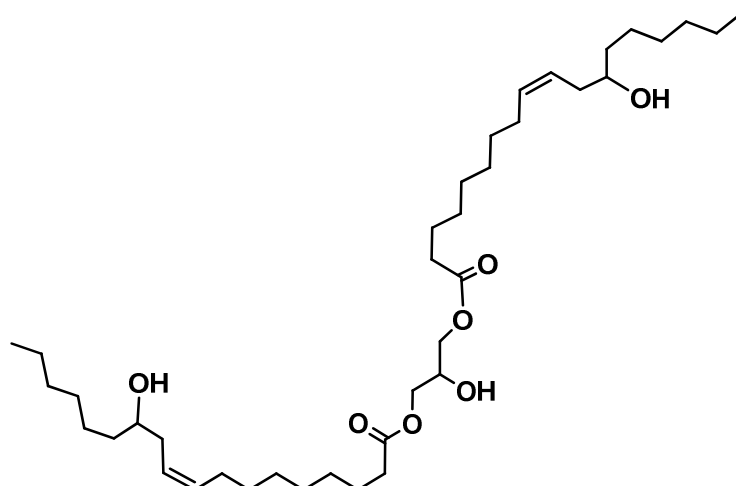
Sinônimos: gliceril 1,3-dilinoato, 1,3-di-([cis,cis]-9,12-octadecadienoil)-rac-glicerol

Fórmula molecular:  $C_{39}H_{68}O_5$

Número no CAS: 15818-46-9

Massa molar:  $616,95 \text{ g mol}^{-1}$

## ❖ 1,3-Diricinoleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): não encontrado

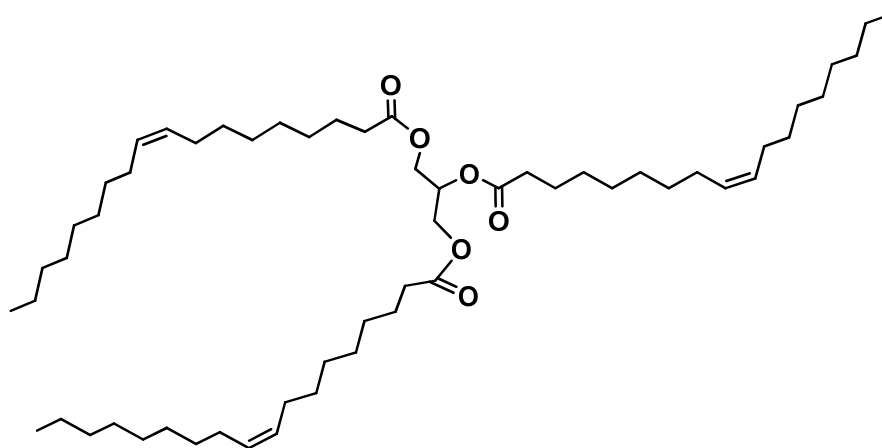
Sinônimos: não encontrado

Fórmula molecular:  $C_{39}H_{68}O_5$

Número no CAS: não encontrado

Massa molar: 652,99

❖ Oleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-bis [[(Z)-octadec-9-enoil] óxi] propil (Z)-octadec-9-enoato

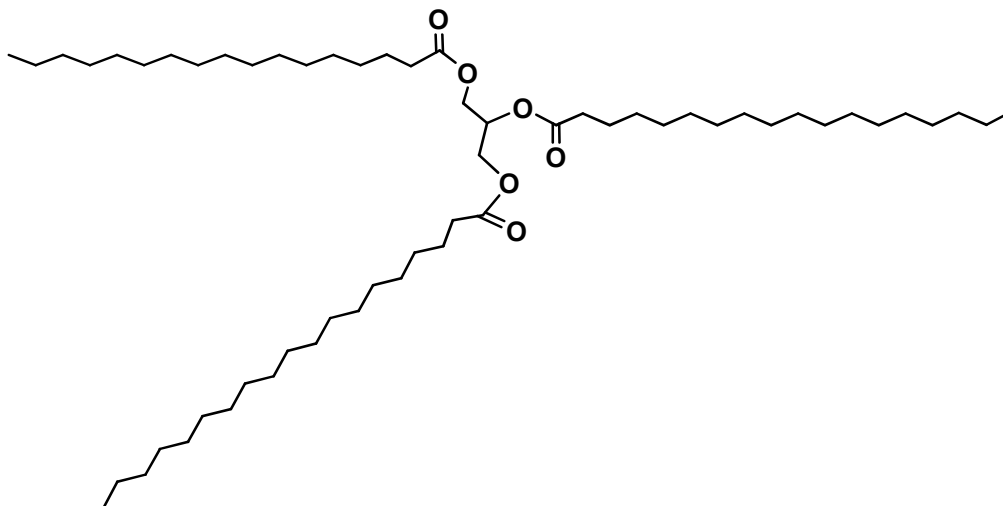
Sinônimos: trioleína, 1, 2, 3-tri(cis-9-octadecenoil)glicerol, glicerol triolato

Fórmula molecular:  $C_{57}H_{104}O_6$

Número no CAS: 122-32-7

Massa molar: 885,43 g mol<sup>-1</sup>

❖ Estearina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 1,3-di (octadecanoilóxi) propan-2-il octadecanoato

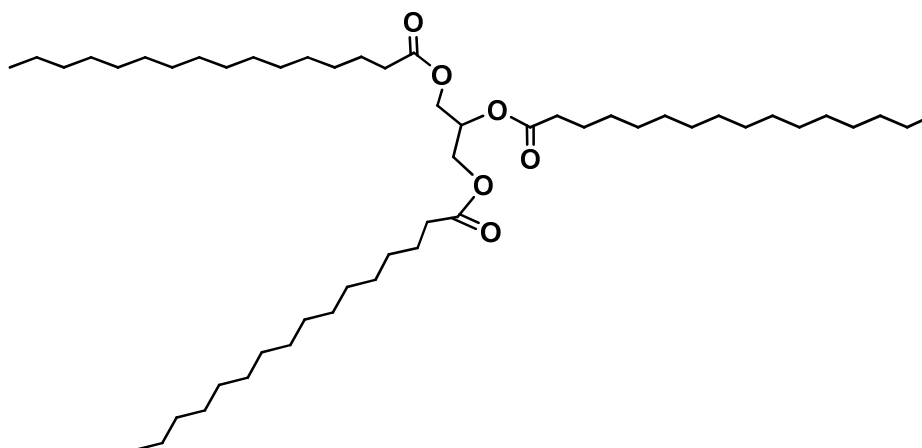
Sinônimos: triestearina, 1,2,3-trioctadecanoilglicerol, glicerol triesterarato

Fórmula molecular: C<sub>57</sub>H<sub>110</sub>O<sub>6</sub>

Número no CAS: 555-43-1

Massa molar: 891,48 g mol<sup>-1</sup>

❖ Palmitina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 1,3-di (hexadecanoiloxi) propan-2-il hexadecanoato

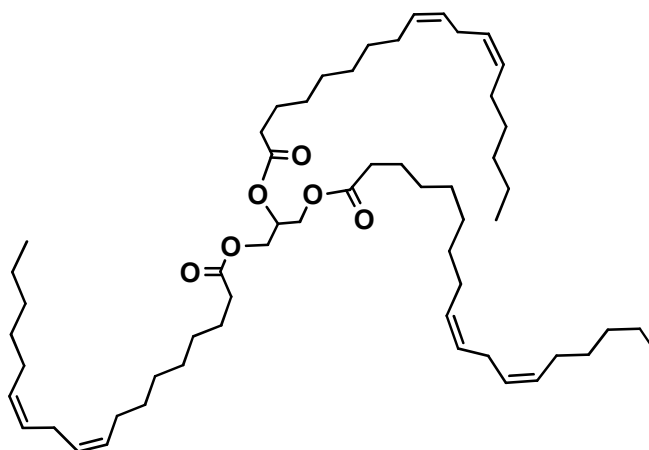
Sinônimos: tripalmitina, glicerol tripalmitato, tripalmitoilglicerol

Fórmula molecular:  $C_{51}H_{98}O_6$

Número no CAS: 555-44-2

Massa molar:  $807,32 \text{ g mol}^{-1}$

❖ Linoleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-di (octadeca-9 ,12-dienoilóxi octadeca) propil-9 ,12-dienoato

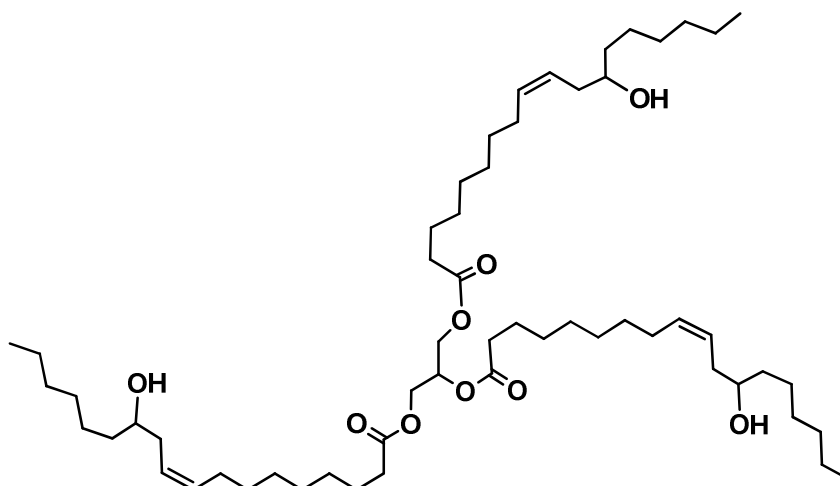
Sinônimos: 1,2,3-tri-(cis, cis-9, 12-octadecadienoil) glicerol, glicerol trilinoleato

Fórmula molecular:  $C_{57}H_{98}O_6$

Número no CAS: 537-40-6

Massa molar:  $879,38 \text{ g mol}^{-1}$

❖ Ricinoleína



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 2,3-bis[[[E]-12-hidroxiocetadec-9-enoil]óxi]propil (E)-12-hidroxiocetadec-9-enoato

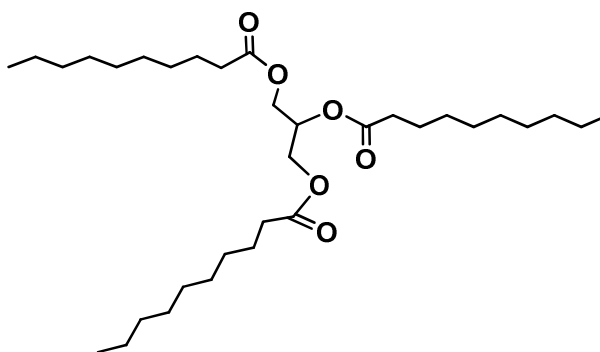
Sinônimos: tricinoleína, gliceril tricinoleato

Fórmula molecular:  $C_{57}H_{104}O_9$

Número no CAS: 2540-54-7

Massa molar:  $933,43 \text{ g mol}^{-1}$

#### ❖ Tricaprina



Função orgânica: éster

Nome químico (IUPAC): 1,3-di (decanoilóxi) propan-2-il decanoato

Sinônimos: tridecanoato de glicerina, glicerol tricaprato, 1,2,3- tridecanoilglicerol, tridecanoato glicerol

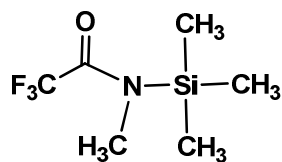
Fórmula molecular:  $C_{33}H_{62}O_6$

Número no CAS: 621-71-6



Massa molar: 554,84 g mol<sup>-1</sup>

❖ MSTFA



Função orgânica: amida

Nome químico (IUPAC): 2,2,2-trifluoro-*N*-metil-*N*-trimetilsililacetamida

Sinônimos: *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida, *N*-trimetilsilil-*N*-metil trifluoroacetamida

Fórmula molecular: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NOSi

Número no CAS: 24589-78-4

Massa molar: 199,25 g mol<sup>-1</sup>